

AGRADECIMIENTOS

A Dani, por abrirme las puertas de este laboratorio y guiarme en este difícil proceso. Por darme la suficiente libertad para tomar mis propias decisiones y por confiar en ellas.

A Pablo y Juan, por estar siempre cerca aunque estuvieran lejos. Por su gran amistad y sobre todo por su gran compañerismo y solidaridad. Por no negarse nunca a dar una mano cuando me hizo falta y por enseñarme el misterioso mundo de la electrofisiología.

A Maru, por ser mi gran amiga y mi mejor compañera. Por tener la enorme capacidad de hacer que las cosas complicadas parezcan simples. Por estar siempre.

A Julian y Santi, porque son grandes amigos. Porque significa mucho para mí tenerlos cerca. Por bancarme en las buenas y en las malas, y estar al pie del cañón cuando mas hace falta.

A Belén y Eleo, por su gran ayuda a lo largo de estos años. Por aconsejarme y por estar siempre dispuestas a darme una mano cuando la necesite. Muchas gracias.

A Pao, Marce, Jessi, Jime, Vivi, Lucía, Javi y Lucha porque hacen que los peores días se pasen rápido y por su incalculable ayuda desinteresada. A Ceci, por su onda contagiosa, por estar bien dispuesta en todo momento y por dejarse ayudar.

Al “Doc” Carrer, que me contagió, además de su disciplina, su enorme pasión por la ciencia y de quien aprendí a disfrutar lo que hago. Gracias por haber guiado mis primeros pasos en la difícil tarea de hacer ciencia.

A Julita Cambiasso, con quien sin duda me hubiera encantado trabajar más tiempo. Gracias por tu incontable apoyo y por tu gran amistad.

A nuestros vecinos “los transgénicos”, por recibirme con la mejor onda en su labo y por los buenos momentos que pase con aquellos con quienes trabaje.

A Elena, por ser una gran amiga. Por hacer que extrañe nuestras largas charlas de catarsis “científiques”. Por saber escuchar y dar los mejores consejos.

A Marcelo Rubinstein, por estar siempre dispuesto ayudarme y aconsejarme. Por darme la posibilidad de trabajar con su gran equipo.

A Vale, Pepi, Soia, Mariela, Cuqui y Mery, mis queridas “losotras”, que están lejos pero las siento muy cerca. Mis amigas de la vida con quienes me río hasta el dolor y me divierto hasta el cansancio.

A Marian y a Paula. Por la fuerte amistad que generamos en tan poco tiempo. Por dejarse conocer y por bancarme hasta el cansancio dentro y fuera de la cancha.

Al CONICET y a la Fundación YPF por financiar esta etapa de mi formación.

A todo el INGEBI y su gente con quienes compartí todos estos años. Gracias por todo.

Al IMMF y su gente, porque fue mi primera casa y lo recuerdo con mucho cariño.

A mi viejos, porque a ellos les debo el poder estar donde estoy. Porque gracias a su gran esfuerzo y sacrificio me hicieron el camino más fácil. Por los valores que me inculcaron a lo largo de todos estos años.

A mis hermanos, porque no existe mejor cosa que poder contar con ellos. A Sheshi, por estar siempre. Por preguntar y sufrir conmigo los avatares de la profesión que elegí.

A Franquito, Camila y Pablo, porque son lo mejor que me paso en la vida. Porque sin ellos, ni esto, ni nada sería posible. Porque hacen que todo en la vida cobre sentido.

A Pablo, Franco y Camila

RESUMEN

La dopamina (DA) es un neurotransmisor que participa en diversas funciones del sistema nervioso central de los mamíferos, como la regulación del movimiento y los procesos cognitivos y emocionales.

Existen cinco subtipos de receptores dopaminérgicos, que se expresan diferencialmente en el cerebro. Particularmente, los receptores dopaminérgicos D4 (D4R) se expresan fuertemente en la corteza prefrontal (CPF) de ratas y ratones adultos. La CPF desempeña un rol importante en la formación de memorias de corto plazo y el control motivacional. Se cree que en humanos, enfermedades neuropsiquiátricas tales como esquizofrenia, Parkinson, Alzheimer y ADHD, están relacionadas con disfunciones en la CPF y con neurotransmisión dopaminérgica. Las células principales de la CPF son neuronas piramidales glutamatérgicas excitatorias. Las neuronas piramidales de las capas más profundas (V y VI), están profusamente invadidas por fibras mesencefálicas provenientes de neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral y representa una de las vías más importantes de modulación extrínseca. A pesar de que existen numerosos trabajos publicados en el tema, los mecanismos de control dopaminérgico y la contribución relativa del D4R en la modulación de la excitabilidad en estas células aun no se conocen en detalle.

Con el objetivo de analizar el rol del D4R en la modulación de la excitabilidad neuronal, caracterizamos los efectos de la DA en el control de la excitabilidad neuronal y la generación de potenciales de acción en las células piramidales (lamina V) de la CPF de ratones salvajes (D4^{+/+}) y de ratones mutantes nulos para el D4R (D4^{-/-}) utilizando la técnica de patch clamp en rebanadas de cerebro.

Este estudio permitió observar, por primera vez en forma directa, una acción inhibitoria postsináptica del D4R sobre las neuronas piramidales de la lámina V de la CPF.

Por otro lado, en la población humana existen variantes polimórficas del gen del D4R en la región codificante para el tercer dominio intracitoplasmático que interactuaría con proteínas G. Este polimorfismo consiste en repeticiones de 2 a 10 veces de secuencias de 48 pb (16 aminoácidos). La existencia de variantes alélicas para los D4R podría implicar diferencias funcionales entre distintos subtipos del receptor.

Con el objeto de caracterizar las propiedades fisiológicas y farmacológicas de los subtipos de D4R humano más frecuentes, se co-expresaron individualmente las variantes de 2, 4 o 7 repeticiones del D4R humano, en ovocitos de *Xenopus laevis*, junto con canales de potasio regulados por proteína G (GIRK). Dopamina, noradrenalina (NA) y serotonina (5HT) activaron y modularon las corrientes de potasio mediadas por canales GIRK luego de la estimulación directa de los D4R. La afinidades aparentes de los D4.2 y D4.7 para DA fueron similares, mientras que los D4.4 mostraron una afinidad aparente por este agonista 5 veces menor. Las curvas dosis-respuesta para NA y 5HT mostraron un perfil de activación similar para las 3 variantes del receptor, y diferencias en la afinidad entre ambos agonistas. NA se comportó como agonista total, mientras que 5HT como agonista parcial. Los resultados obtenidos revelaron dos aspectos de los D4R que poseen un interés particular. Por un lado que las distintas variantes alélicas pueden presentar diferencias funcionales. Por otra parte, la activación directa de los D4R por NA y 5HT podría tener implicancias fisiológicas muy relevantes.

ABSTRACT

Dopamine D4 receptors (D4R) are strongly expressed in the prefrontal cortex (PFC) and are believed to play a crucial role in cognitive function and neuropsychiatric disorders. Dopamine (DA) modulates PFC neuronal excitability but the relative contribution of D4R to this modulation remains to be established.

In order to understand the role of D4R in the control of neuronal excitability and action potential generation, we performed whole-cell patch clamp recordings in layer V PFC pyramidal neurons using a model of D4R-deficient mice (D4^{-/-}). Results were in agreement with previous reports describing D4^{-/-} mice cortical hyperexcitability and suggest an inhibitory role for D4R in the control of action potential firing of PFC pyramidal neurons.

Human D4R (hD4R) is highly polymorphic, particularly in the third cytoplasmic domain where a variable number of 48 bp repeats and single nucleotide polymorphisms account for more than 35 different alleles already detected in the population. We studied the functional activation of different polymorphic variants of the human dopamine D4 receptors (D4R) by the three major central monoamines, DA, noradrenaline (NA) and serotonin (5-HT). D4Rs carrying two (D4.2), four (D4.4) or seven (D4.7) repeats within the third intracellular domain were co-expressed with G protein-regulated inwardly rectifying potassium channels (GIRK) in frog oocytes. All the D4R variants coupled to oocyte G_{i/o} proteins and modulated co-expressed GIRK1 channels. DA, NA and 5-HT stimulated hD4Rs, dose-response analysis showed that DA and NA are full agonists whereas 5-HT acted as a partial agonist. DA was 5-fold more potent on D4.2 and D4.7 than on D4.4. In contrast, NA and 5-HT did not discriminate among D4R variants.

Our data indicate that hD4Rs variants can be pharmacologically stimulated by any of the three major central monoamines and the ability of these interactions may potentially have important physiological consequences.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
LA CORTEZA CEREBRAL	1
<i>Citoarquitectura de la corteza cerebral</i>	1
<i>Patrón de descarga de las neuronas corticales</i>	2
LA CORTEZA PREFRONTAL	3
<i>Neuronas piramidales de la lámina V</i>	5
<i>Conectividad de la corteza prefrontal</i>	6
<i>Inervación monoaminérgica de la CPF</i>	7
LA NEUROTRANSMISIÓN DOPAMINÉRGICA	8
<i>Los sistemas dopaminérgicos centrales</i>	9
LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS	12
<i>Clasificación y estructura</i>	12
<i>Distribución y localización celular</i>	14
<i>Propiedades farmacológicas</i>	16
EL RECEPTOR DOPAMINÉRGICO D4.	17
<i>Localización</i>	17
<i>Polimorfismos del D4R</i>	18
<i>Papel funcional del D4R</i>	20
OBJETIVOS	23
MATERIALES Y MÉTODOS	24
1. EXPRESIÓN DE RECEPTORES Y REGISTRO EN	
OVOCITOS DE <i>Xenopus laevis</i>	24
1.1 <i>Ranas y ovocitos</i>	24
1.2 <i>Preparación de los templados de ADNc y transcripción in vitro de los ARN</i>	24
1.3 <i>Inyección de ovocitos</i>	25
1.4 <i>Registros electrofisiológicos</i>	27
2. TÉCNICA DE “PATCH CLAMP” EN RODAJAS DE CEREBRO	29
2.1 <i>Ratones salvajes y mutantes nulos para D4R</i>	29
2.2. <i>Genotipificación de los ratones mutantes</i>	30

2.2.1 Extracción del DNA	30
2.2.2 Genotipificación por PCR	30
2.3 Obtención de rodajas de cerebro	31
2.4 Registros electrofisiológicos.....	33
2.5 Inmunohistoquímica de rodajas de cerebro	36
3. ANÁLISIS DE DATOS	37
4. DROGAS Y SOLUCIONES UTILIZADAS	37
4.1 Drogas	38
4.2 Soluciones extracelulares de patch clamp.....	39
4. Soluciones intracelulares de patch clamp	39
CAPÍTULO I.....	40
Rol del receptor D4 dopaminérgico en el control de la excitabilidad de las neuronas piramidales de la corteza prefrontal.....	40
I.1.INTRODUCCIÓN.....	41
I.2 RESULTADOS.....	41
<i>Identificación visual de las neuronas a registrar</i>	<i>41</i>
<i>Caracterización de las propiedades pasivas y activas de las NPLV</i>	
<i>Comparación entre D4^{+/+} y D4^{-/-}</i>	<i>42</i>
<i>Patrón de disparo de los potenciales de acción</i>	<i>42</i>
<i>Neuronas de disparo regular (RS).....</i>	<i>44</i>
<i>Neuronas de disparo intermedio (IM)</i>	<i>46</i>
<i>Neuronas de disparo en ráfagas (IB)</i>	<i>48</i>
<i>Caracterización de las corrientes espontáneas en ratones D4^{+/+} y ratones D4^{-/-}:</i>	
<i>Análisis de corrientes post-sinápticas excitatorias</i>	<i>51</i>
<i>Frecuencia y amplitud</i>	<i>51</i>
<i>Efecto de dopamina en el control de la excitabilidad neuronal: participación del D4R.....</i>	<i>54</i>
<i>Efecto de DA sobre el número de potenciales de acción evocados.....</i>	<i>54</i>
<i>Efecto de DA sobre las propiedades eléctricas de los potenciales de acción: análisis de espigas.</i>	<i>60</i>
I.3 DISCUSIÓN.....	62

<i>Patrón de disparo de potenciales de acción y análisis de espigas: Contribución del D4R en el modelado de conexiones sinápticas y la formación de circuitos neuronales durante el desarrollo.</i>	62
<i>Corrientes excitatorias espontáneas: Rol presináptico del D4R</i>	65
<i>Participación del D4R en el control de la excitabilidad cortical en las NPLV</i>	67
<i>Efectos del D4R independientes de la transmisión sináptica (rápida)</i>	68
CAPÍTULO II	71
Propiedades farmacológicas y funcionales de las	71
variantes polimórficas del receptor	71
dopaminérgico D4 humano	71
II.1. INTRODUCCIÓN	72
II.2. RESULTADOS	72
<i>La estimulación del hD4R por dopamina, noradrenalina y serotonina, modula las corrientes de K⁺ mediadas por GIRK1.</i>	72
<i>Análisis de curvas dosis-respuesta para DA, NA y 5HT sobre las distintas variantes polimórficas del hD4R.</i>	76
<i>Propiedades farmacológicas del hD4R</i>	79
II.3 DISCUSIÓN	82
<i>Relevancia funcional de las variantes polimórficas del hD4R</i>	82
<i>Participación del 3er dominio intracelular del receptor en la interacción con el canal GIRK1</i>	83
<i>Acciones de dopamina, noradrenalina y serotonina en hD4R</i>	84
REFERENCIAS	88

INTRODUCCIÓN

LA CORTEZA CEREBRAL

Citoarquitectura de la corteza cerebral

Existen características de la citoarquitectura cortical que son comunes en todas las áreas de la corteza, como la estratificación de las células en capas o la regularidad en ciertas conexiones. Con toda probabilidad, esta organización laminar posee una gran relevancia funcional.

Las neuronas de la corteza están dispuestas en láminas que se ubican paralelamente a los huesos del cráneo. La lámina I, es la capa más externa y está en contacto con la meninge (*pía mater*), mientras que la capa mas interna (lámina VI), se ubica a continuación de la sustancia blanca. Estas láminas pueden diferenciarse principalmente por el tamaño, el número de células y la densidad de axones mielinizados que poseen. La lámina I es prácticamente acelular y está compuesta fundamentalmente por axones que interconectan distintas regiones de la corteza. La lámina II ó capa granular externa generalmente es estrecha y está densamente poblada de neuronas piramidales de somas relativamente pequeños. La lámina III es de mayor espesor y se caracteriza por la presencia de neuronas piramidales de cuerpos celulares grandes. La lámina IV, denominada capa granular interna, está compuesta por neuronas estrelladas espinosas y carece de neuronas piramidales. Esta capa tiene un espesor bastante variable dependiendo de la región de la corteza que se trate. La lámina V tiene un espesor considerable y se caracteriza por la presencia de neuronas piramidales de somas grandes cuya dendrita apical llega hasta la lámina I. La lámina VI es la más profunda y posee tipos celulares multiformes (Fuster, 1997).

Las neuronas piramidales son la población neuronal mayoritaria en la corteza (alrededor de un 75-80% del total) y son glutamatérgicas. A nivel morfológico, están constituidas por un soma de aproximadamente 25-50 μm de diámetro, un conjunto de dendritas basales que se encuentran cerca del soma y una dendrita apical, que proyecta hacia las capas superficiales.

Las interneuronas GABAérgicas representan el 15-30% de la población neuronal de la corteza y proporcionan un control local inhibitorio (Beaulieu, 1993; Somogyi et al., 1998; DeFelipe et al., 2002). Estas neuronas no poseen espinas dendríticas y sus somas no son piramidales. En los últimos años se ha estudiado mucho su morfología, bioquímica y patrón de descarga, sin embargo, al tratarse de un grupo tan heterogéneo aún no se ha llegado a un consenso respecto a su clasificación (McCormick et al., 1985; Connors and Gutnick, 1990; Cauli et al., 1997; Kondo and Kawaguchi, 2001; Kawaguchi and Kondo, 2002).

Patrón de descarga de las neuronas corticales

El estudio *in vivo* de los patrones de descarga de las neuronas piramidales ha llevado a clasificarlas en al menos cuatro grupos: neuronas de disparo regular o RS (del inglés “*regular spiking*”), de disparo en ráfagas o IB (del inglés “*intrinsically bursting*”), de disparo oscilatorio en ráfagas o ROB del inglés “*repetitive oscillatory bursting*”) y neuronas de disparo intermedio o IM (del inglés “*intermediate*”) cuyo fenotipo electrofisiológico, es, como lo indica el nombre, intermedio entre las neuronas RS y las IB (Connors and Gutnick, 1990; Yang et al., 1996). Todas estas características se han descrito por técnicas de registro intracelular mediante la aplicación de pulsos despolarizantes a la membrana de las células.

Las neuronas RS son las más abundantes y se hallan distribuidas en todas las láminas. Las mismas, disparan potenciales de acción simples a una frecuencia inicial alta que va disminuyendo con el tiempo mientras se mantiene el estímulo. Este fenómeno se denomina “adaptación” y su grado es muy variable de una célula a otra. Es característico en este tipo neuronal, la presencia de una hiperpolarización postpotencial de acción (AHP) prominente que contribuye haciendo más pronunciado el fenómeno de adaptación.

Por otro lado, las neuronas IM se caracterizan por la presencia de una hiperpolarización rápida (fAHP) y de una hiperpolarización de longitud media (mAHP) que se producen después de cada potencial de acción. Además, se ha caracterizado en estas mismas células, una pequeña depolarización (DAP) que aparece entre medio de ambas hiperpolarizaciones después del primer potencial de acción, que disminuye a medida que aumenta el pulso depolarizante y la neurona responde evocando mayor cantidad de espigas.

En las neuronas con patrón de disparo en ráfagas o IB, luego de la primera espiga, es

característica la presencia de una despolarización dependiente de calcio (DAP) seguida rápidamente por el disparo de otra espiga, en la mayoría de los casos de una amplitud menor a la primera (Yang et al., 1996).

Las neuronas con disparo oscilatorio en ráfagas o ROB, se identifican por disparar potenciales de acción espontáneos que se repiten en forma oscilatoria.

Como se mencionó anteriormente, el grupo de neuronas inhibitorias gabaérgicas es muy heterogéneo, sin embargo, la mayoría de estas células presentan un tipo de patrón que se caracteriza por la descarga de potenciales de acción de muy corta duración y alta frecuencia. A su vez, no poseen adaptación y presentan AHPs de gran amplitud. Este gran grupo de neuronas ha sido clasificado como neuronas de disparo rápido o FS (del inglés “*fast spiking*”)(Yang et al., 1996).

A pesar de su gran utilidad para el estudio de las neuronas, en los últimos tiempos la clasificación por fenotipo electrofisiológico ha sido cuestionada. Trabajos muy recientes proponen que los patrones de disparo son intercambiables en una misma célula. Esto implica que las neuronas son capaces de modificar el patrón de disparo frente a pequeños cambios que se produzcan en sus condiciones fisiológicas (Friedman and Gutnick, 1989; Steriade et al., 2001; Steriade, 2004).

LA CORTEZA PREFRONTAL

El lóbulo frontal está constituido por la corteza motora, premotora y prefrontal. La corteza prefrontal (CPF) es un área del cerebro de los mamíferos involucrada en múltiples funciones cognitivas. Esta área, desempeña un rol importante en la formación de memorias de corto plazo (por ej: memoria de trabajo) y el control motivacional (por ej: en mecanismos de refuerzo desencadenados durante procesos de abuso a drogas). Se cree que en humanos, enfermedades neuropsiquiátricas tales como esquizofrenia, Parkinson, Alzheimer y el Déficit de Atención e Hiperactividad (en inglés “*ADHD*”) están relacionadas con disfunciones en la CPF (Fuster, 1997).

En primates, la CPF comprende las áreas 8-13, 24, 32, 46 y 47 del mapa citoarquitectónico de Brodmann (Brodman, 1909) (Fig.1) y constituye casi una tercera parte del neocortex. Se divide en dos regiones principales: orbitomedial y dorsolateral. La región

orbitomedial está implicada en el comportamiento emocional, mientras que la dorsolateral, participa en la organización temporal del comportamiento, el lenguaje y el razonamiento. La memoria de trabajo y la integración temporal, también son funciones controladas por la ésta región, que, en humanos, alcanza su mayor desarrollo (Fuster, 2001).

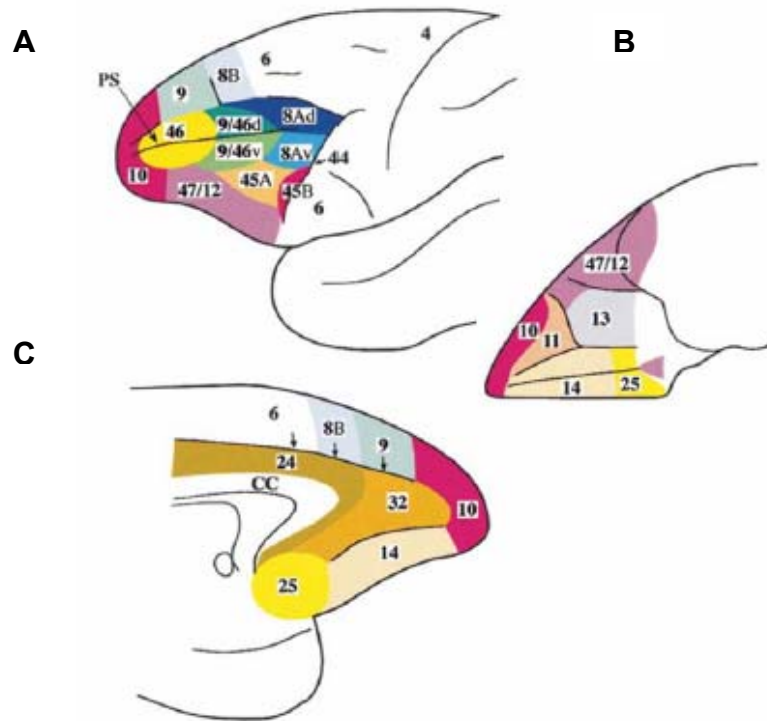


Figura 1. Estructura de la corteza prefrontal mono. Vista lateral (A), vista medial (B), vista inferior (C) de la corteza prefrontal de mono (actualización de Petrides y col. (Petrides and Pandya, 1984) del mapa de Brodmann). El esquema muestra las áreas del mapa de Brodmann que conforman la CPF en los primates (ver texto).

En la rata, la CPF se subdivide en tres áreas principales: lateral, orbital y medial (Fig.2). La corteza prefrontal medial (CPFm) se divide, a su vez, en tres zonas: cingulada anterior (Cg1), prelímbica (PL) e infralímbica (IL). Existen múltiples diferencias anatómicas y funcionales entre la CPF de primates y la de no primates. Sin embargo, hay consenso de que el criterio más sensible para delimitar la CPF en las diferentes especies es definirla como aquella región que recibe inervación directa del núcleo dorsal del tálamo, que en los roedores correspondería a las áreas corticales PL e IL (Fuster, 1997).

Aunque no está clara la función de estas subdivisiones en la rata, estudios recientes postulan que la zona PL participaría en las funciones límbico-cognitivas (homólogas a la

CPF dorsolateral de primates), y la zona IL controlaría actividades viscerales-autónomas (homólogas a la CPF orbitomedial de primates) (Vertes, 2004).

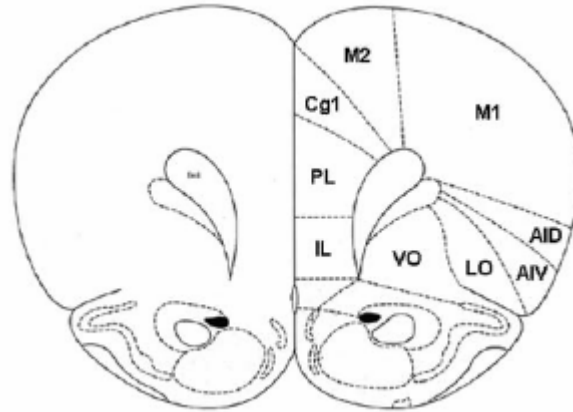


Figura 2. Vista coronal de la corteza prefrontal de rata. [+3.2 mm anterior a bregma, atlas de Paxinos y Watson, 1998(Paxinos and Watson, 1998)]. Área lateral: AID y AIV, corteza agranular insular dorsal y ventral; área ventral: VO y LO, corteza orbital ventral y lateral; área medial: Cg1, corteza cingulada; PL, corteza prefrontal; IL, corteza infralímbica. También se muestran las áreas motoras 1 y 2, M1 y M2.

Neuronas piramidales de la lámina V

Al igual que el resto de la corteza cerebral, la CPF se encuentra organizada en seis láminas paralelas a los huesos craneales. La capa I es la más fácil de delimitar ya que en ella no se encuentran somas de neuronas piramidales (McCormick et al., 1985). El cuerpo de las neuronas piramidales se localiza en las capas I/III (piramidales pequeñas), V y VI (piramidales grandes). Las dendritas apicales de las neuronas piramidales se disponen perpendicularmente a la línea media y terminan en la capa I. Aparte de las neuronas piramidales, existe una población de interneuronas gabaérgicas que están distribuidas homogéneamente en todas las capas corticales, incluyendo la capa I.

Existe una especificidad laminar en el tipo de proyecciones de la corteza frontal: las neuronas piramidales de las capas II/III proyectan a otras áreas de la misma corteza, las de la capa VI al tálamo y algunas zonas corticales y son principalmente las neuronas piramidales de la lámina V (NPLV) las que canalizan la señal de salida hacia una gran cantidad de estructuras subcorticales (Lambe et al., 2000). Por su morfología particular, y la arquitectura

de sus conexiones, estas últimas, junto con las neuronas de la lámina VI representan una de las principales vías de salida de la información procesada en la CPF (Ding et al., 2001).

Conectividad de la corteza prefrontal

A nivel subcortical, la CPF proyecta preferentemente al tálamo, a los núcleos aminérgicos del mesencéfalo [núcleo del rafe (NR), *locus coeruleus* (LC) y área tegmental ventral (ATV)]; al hipotálamo lateral, a los ganglios basales (caudado-putamen, núcleo accumbens y partes estriatales del tubérculo olfatorio), a la habénula lateral y al sistema límbico (amígdala e hipocampo) (Berendse and Groenewegen, 1991; Groenewegen et al., 1997; Groenewegen and Uylings, 2000). En particular, en la CPFm de rata las proyecciones que salen desde la zona IL y proyectan al cerebro medio, amígdala e hipotálamo, son más prominentes y están más ampliamente distribuidas que aquellas que provienen de la región PL y proyectan a las mismas regiones (Fig. 3). (Takagishi and Chiba, 1991; Vertes, 2004).

Mucha de la conectividad de la CPF con las estructuras subcorticales es recíproca. Es decir, la CPF recibe aferencias principalmente del tálamo, de los núcleos aminérgicos, del sistema límbico (complejo amigdaloides basal e hipocampo ventral) y del hipotálamo. Tanto la amígdala como el hipotálamo proyectan a las porciones ventral y medial de la CPF (Ray and Price, 1993). Asimismo, las aferencias del hipocampo llegan a todas las regiones prefrontales (Barbas and Blatt, 1995). Por la arquitectura de sus conexiones, la CPF es la corteza integradora de información por excelencia. Comprende un conjunto de áreas neocorticales interconectadas que envía y recibe proyecciones de, virtualmente, todos los sistemas sensoriales corticales, sistemas motores y muchas estructuras subcorticales. (Groenewegen and Uylings, 2000).

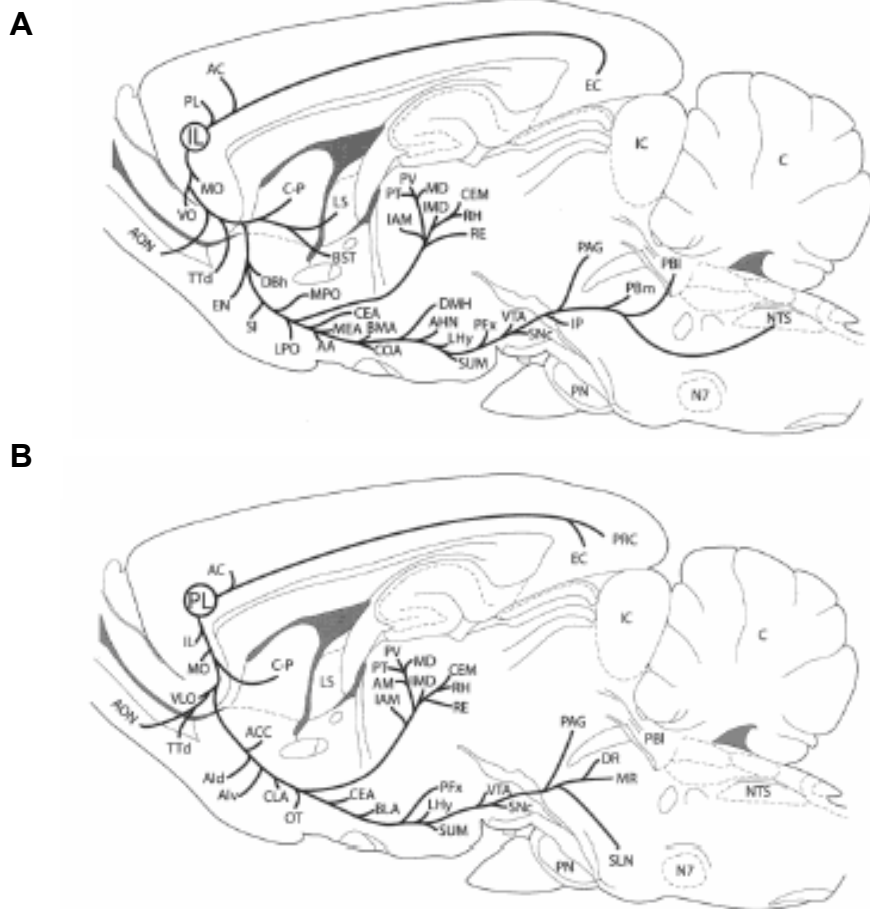


Figura 3. Representación esquemática de cortes sagitales del cerebro de rata. En la figura, se muestran las principales proyecciones que, desde las distintas regiones de la CPF proyectan al cerebro medio, amígdala e hipotálamo. Las proyecciones que salen desde la corteza IL (A) son mas prominentes y se distribuyen mas ampliamente que las salen desde la corteza PL (B). Modificado de Vertes 2004 (Vertes, 2004).

Inervación monoaminérgica de la CPF

Existen tres vías de neurotransmisión monoaminérgica que contribuyen significativamente al control de la excitabilidad neuronal en la CPF. Estas vías se originan en el tallo cerebral e inervan la CPF a través de fibras ascendentes sin relevo talámico, constituyendo una de las principales vías de entrada a la CPF. Las neuronas de las capas más profundas (V y VI), están profusamente inervadas por fibras dopaminérgicas provenientes del ATV mesencefálica y en menor grado, por fibras noradrenérgicas del sistema coeruleo-cortical y serotoninérgicas, provenientes del NR (Fuster, 1997).

La inervación dopaminérgica de la CPF ha sido extensamente estudiada tanto a nivel anatómico como funcional (Lewis et al., 1998; Carr et al., 1999; Sesack and Carr, 2002). Se sabe que en primates los terminales dopaminérgicos inervan toda la corteza frontal, mientras que en la rata esta inervación es más discreta y mayoritaria para la CPFm.

Por el contrario, la inervación noradrenérgica y serotoninérgica está menos estudiada (Robbins, 2000). La NA ejercería respuestas complejas en la CPFm, con una predominancia de respuestas inhibitorias mediadas por interneuronas GABAérgicas (Branchereau et al., 1996). A su vez, las proyecciones serotoninérgicas provenientes del NR parecerían ser diferentes según provengan del NR medial o dorsal (O'Hearn and Molliver, 1984).

Evidencias neuroanatómicas recientes demuestran la convergencia de fibras serotoninérgicas y dopaminérgicas sobre las mismas neuronas piramidales y sobre las interneuronas gabaérgicas de la CPFm de ratas (Benes et al., 2000).

Dado que los objetivos planteados en esta tesis se orientan a estudiar la participación del receptor dopaminérgico D4 en el control de la excitabilidad de las neuronas piramidales de la CPF, y la inervación dopaminérgica de esa región esta involucrada en dicho control, en la sección siguiente resumiremos los aspectos fundamentales de la neurotransmisión dopaminérgica.

LA NEUROTRANSMISIÓN DOPAMINÉRGICA

La dopamina (DA) representa más del 50% del contenido total de catecolaminas del cerebro, siendo por ello la más importante del sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos. Sin embargo, no fue hasta su descubrimiento en 1958 que fue reconocida propiamente como neurotransmisor. Esta catecolamina, participa en la regulación de diversas funciones tales como la conducta motora, los procesos cognitivos y emocionales, los mecanismos de recompensa y la regulación neuroendócrina. La disfunción en la neurotransmisión dopaminérgica ha sido asociada al desarrollo de patologías humanas tales como la enfermedad de Parkinson, la esquizofrenia y la hiperprolactinemia entre otras.

Los sistemas dopaminérgicos centrales

El sistema dopaminérgico central de los mamíferos puede dividirse en tres vías neuronales principales: la vía nigroestriatal (A9), la vía mesolímbico-mesocortical (A10) y la vía tuberoinfundibular (A12); (Dahlstroem and Fuxe, 1964) (Fig.4).

Vía nigroestriatal:

El sistema nigroestriado se origina en la sustancia nigra, que es un núcleo de neuronas localizado en el mesencéfalo (A9) (Fig.4). Éste núcleo puede dividirse en dos partes: la sustancia nigra *pars compacta* (SNpc), formada por neuronas dopaminérgicas, y la sustancia nigra *pars reticulata* (SNpr), formada principalmente por neuronas GABAérgicas. Las neuronas dopaminérgicas con origen en la sustancia nigra constituyen el principal tracto dopaminérgico en el cerebro, y proyectan axones que proporcionan una densa inervación al núcleo caudado y al putamen del cuerpo estriado. Aproximadamente un 80% de toda la DA que se encuentra en el cerebro se halla en el cuerpo estriado. Este sistema cumple un papel fundamental en el planeamiento, iniciación y coordinación de los movimientos voluntarios y los comportamientos complejos (Graybiel, 1990). La degeneración de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales conduce a la enfermedad de Parkinson, que se evidencia por la rigidez postural y la capacidad de iniciar movimientos voluntarios.

Sistema mesolímbico-mesocortical:

El sistema mesolímbico-mesocortical tiene su origen en el área tegmental ventral mesencefálica. Dicho núcleo contiene células dopaminérgicas (A10) que envían proyecciones a la corteza frontal y el lóbulo límbico, conformando los circuitos mesocortical y mesolímbico respectivamente (Fig.4).

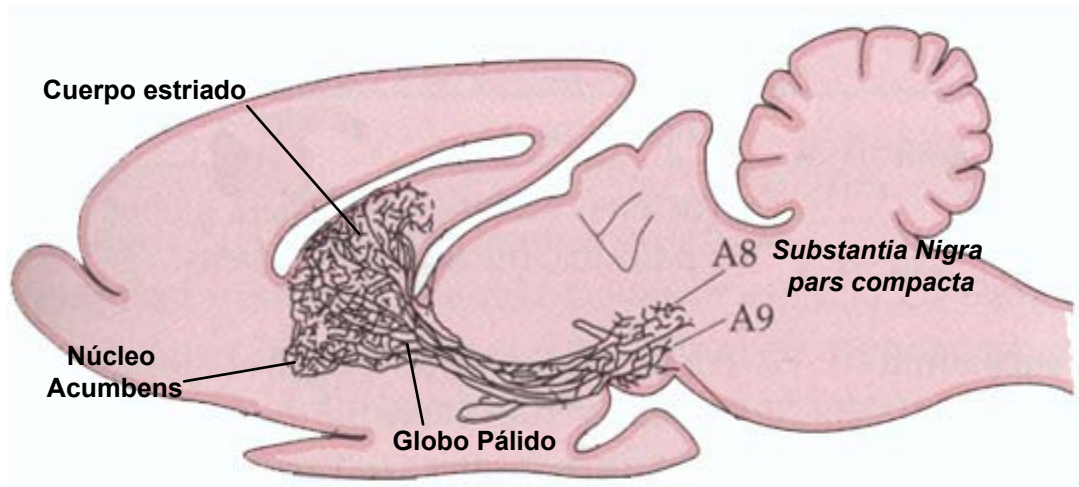
El sistema mesolímbico se distribuye por el sistema límbico con excepción del hipocampo; proyectándose hacia el núcleo acumbens, tubérculo olfatorio, núcleo central de la amígdala, septum lateral y núcleo intersticial de la estría terminal. Estas neuronas presentan un interés particular por estar involucradas en los efectos euforizantes y de refuerzo producidos por el consumo de drogas de abuso tales como la cocaína, el alcohol y las anfetaminas (Di Chiara, 1995).

El sistema mesocortical proyecta principalmente hacia la corteza prefrontal, la corteza cingulada y la corteza entorrinal; áreas corticales relacionadas con funciones emocionales, motivacionales y cognitivas. En conjunto, ambos sistemas contribuyen en mantener la atención, la ideación, la evaluación correcta de la realidad, la motivación y el control del pensamiento (Goldman-Rakic, 1995a).

Sistema tuberoinfundibular:

Este sistema se origina en el núcleo arcuato (A12) del hipotálamo y se proyecta hacia el lóbulo intermedio de la hipófisis (Fig.4). Las neuronas de éste sistema desempeñan un papel importante en la regulación de la liberación de las hormonas pituitarias, especialmente la prolactina. Las alteraciones de esta vía neuroendócrina modifican la liberación de hormonas hipofisarias generando problemas metabólicos y de fertilidad, que pueden conducir al desarrollo de tumores hipofisarios (Kelly et al., 1997).

Sistema Dopaminérgico Nigroestriatal



Sistema Dopaminérgico Mesocorticolímbico y Tuberoinfundibular

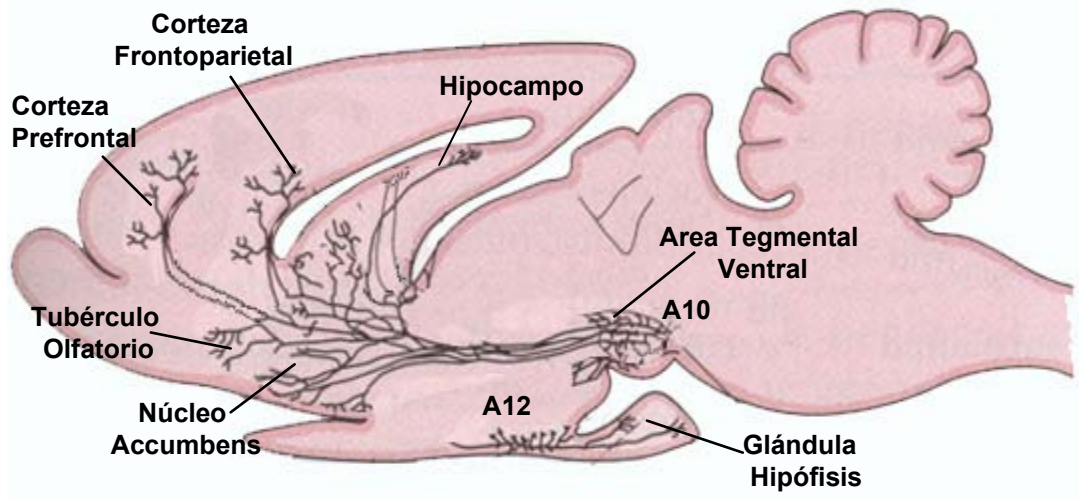


Figura 4: Sistemas dopaminérgicos centrales en el ratón. Las neuronas de la vía dopaminérgica nigroestriatal (A9) presentan los cuerpos celulares en la *substantia nigra pars compacta*, en el cerebro medio y proyectan sus axones hacia el cuerpo estriado. El sistema mesocorticolímbico posee los cuerpos celulares en el área tegmental ventral (A10) y proyecta hacia el núcleo accumbens, el hipocampo, el tubérculo olfatorio, la corteza prefrontal y corteza entorrinal. La vía más corta (A12) se origina en el núcleo arcuato del hipotálamo e inerva los vasos portales de la hipófisis. (Tomado de (Fuxe et al., 1985))

LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS

Clasificación y estructura

Con base en sus características moleculares, se han descrito 5 tipos de receptores para la DA, los cuales han sido agrupados en dos subfamilias farmacológicas denominadas “tipo-D1” y “tipo- D2” a partir de su capacidad de estimular o inhibir la producción de AMPc respectivamente. La familia de los D1 incluye los receptores D1 (D1R) y D5 (D5R); y la subfamilia D2 incluye los receptores D2 (D2R), D3 (D3R) y D4 (D4R) (Andersen et al., 1990). Así, por medio de proteínas G del tipo Gs, los receptores del “tipo-D1” activan la adenil ciclase (AC) y los “tipo-D2” actúan inhibiendo la AC por medio de proteínas Gi/G₀ (Kebabian and Calne, 1979). A su vez, los receptores de la subfamilia D2 activan también a los canales de K⁺ operados por receptores y estimulan a la fosfolipasa C (PLC), por vía de subunidades βγ liberadas a partir de la proteína Gi activada, para convertir al bisfosfato de fosfatidilinositol (PIP₂) en trifosfato de inositol (IP₃) y diacilglicerol (DAG), con modulación secundaria del Ca²⁺ y las proteinquinasas. (Baldessarini and Tarazi, 1996).

Todos los receptores dopaminérgicos pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G, con un extremo extracelular amino-terminal, siete dominios transmembrana y un extremo intracelular carboxi-terminal (Sibley and Monsma, 1992) (Fig.5). Las secuencias aminoacídicas de los receptores dopaminérgicos dentro de sus segmentos transmembranales mantienen un 31 % de homología entre los 5 subtipos (Civelli *et al.*, 1993).

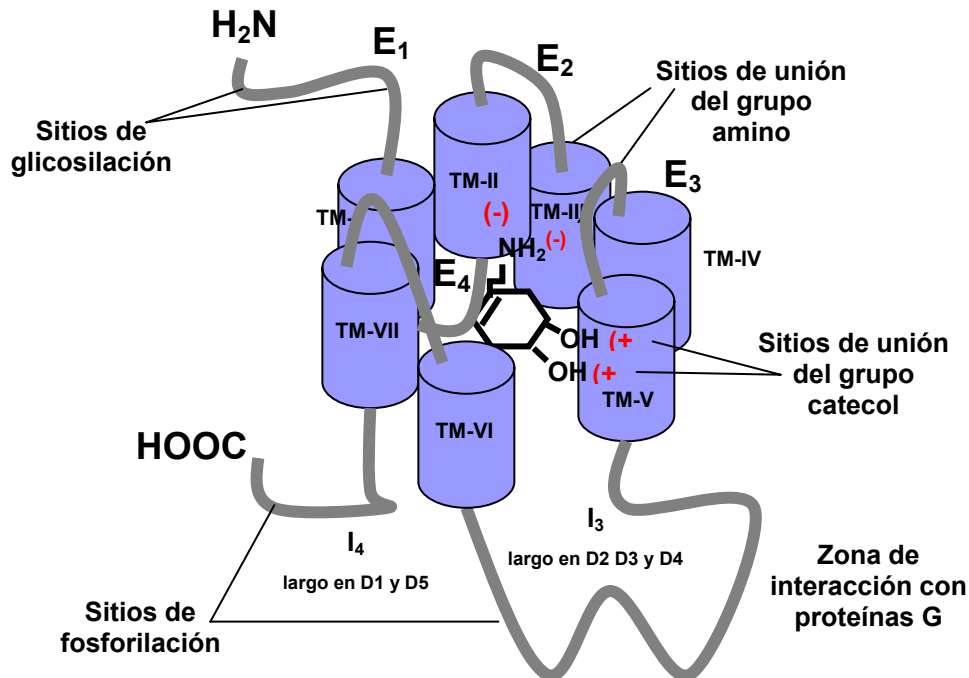


Figura 5: Estructura de los receptores dopaminérgicos. El esquema muestra la estructura de los 7 pasos transmembrana que poseen todos los subtipos de receptores dopaminérgicos. Del lado intracelular, se encuentra el extremo carboxi-terminal y del lado externo, el amino-terminal. TM: dominios transmembrana; E: dominios extracelulares; I: dominios intracelulares. En los cinco tipos de receptores existen sitios externos de glicosilación y sitios internos de fosforilación que regulan la actividad del receptor. También se indican las posiciones en los dominios transmembrana que son importantes para la unión de la dopamina (Tomado y modificado de Avale 2004(Avale, 2004).

Las dos familias de receptores dopaminérgicos muestran también diferencias importantes en sus características moleculares. La homología de secuencias entre los dos miembros de la familia de receptores D1, D1R y D5R, resulta del 80%. Este hecho sugiere un origen evolutivo común separado de los receptores del tipo D2, con el que comparten apenas el 46% en la homología de sus secuencias.

Dentro de la familia de receptores D2, la homología de secuencias entre el D2R y D3R alcanza el 75%, en tanto que el D4R solamente posee un 53% de homología con el D2R.

A su vez, los receptores de la subfamilia D1 tienen el tercer loop intracelular corto y un largo extremo carboxi terminal, mientras que los de la subfamilia D2 tienen el tercer loop intracelular largo y un corto extremo carboxi terminal. Este tercer loop intracelular se postula que es el más importante para la interacción con la proteína G (Senogles et al., 2004). Para la

subfamilia de receptores D2 se han descrito distintas variantes que poseen distintas longitudes en el tercer loop intracelular. En particular, el D2R se caracteriza por poseer dos variantes principales, D2_{corto} y D2_{largo}, producidas por la inclusión alternativa del sexto exón (Dal Toso et al., 1989). Ambas variantes están presentes en humanos y roedores. El D3R, por su parte, está constituido por un gen que codifica para una proteína de 400 aminoácidos y también presenta una variante corta D3_{gly9} de 342 aminoácidos (Rietschel et al., 1993). El gen del D4R en humanos presenta una gran cantidad de polimorfismos. Dado que en esta tesis se estudiarán los polimorfismos de este receptor, se destinará una sección especial para describirlos en forma detallada.

Distribución y localización celular

Existen diferencias en la distribución en el SNC de los diferentes receptores dopaminérgicos. Los estudios de localización de los receptores ha sido determinada mediante la combinación de diferentes técnicas experimentales como la utilización de ligandos marcados radioactivamente (“binding”), desarrollo de anticuerpos específicos o técnicas de biología molecular, como Northern blot e hibridación *in situ*, que detecta a los diferentes RNA mensajeros que codifican la síntesis de los subtipos de receptores dopaminérgicos (Jaber et al., 1996).

A nivel cerebral, el D1R es el receptor mas ampliamente distribuido y el que posee los más altos niveles de expresión en comparación con los demás receptores dopaminérgicos. Este receptor se ha encontrado en el estriado, núcleo accumbens, tubérculo olfatorio, sistema límbico, y en menor medida en hipotálamo, tálamo y corteza prefrontal. El receptor D1 estaría implicado en el control del movimiento, funciones cognitivas y funciones cardiovasculares. Dentro de la misma subfamilia de los D1R, el D5R, es muy escaso y se encuentra principalmente en el hipotálamo, hipocampo y núcleos del tálamo; la función de este receptor aún no está del todo aclarada (Tiberi et al., 1991; Jackson and Westlind-Danielsson, 1994). Dentro de la subfamilia “tipo- D2”, el D2R es el que más alta expresión posee en el cerebro. Al igual que el D1R, el D2R se encuentra principalmente en los lugares donde proyectan las vías nigroestriada y mesolímbica, y en menor medida en la

corteza cerebral y en la hipófisis. Este receptor estaría implicado en la regulación de la función motora, de ciertos aspectos de la conducta y en la secreción de prolactina.

El D3R se localiza predominantemente en áreas límbicas y en menor medida en regiones de la corteza, encontrándose en muy baja proporción en el estriado.

El desarrollo de anticuerpos específicos ha hecho posible, en algunos casos, definir la localización celular y subcelular en las diferentes regiones del cerebro de primates y roedores. Tanto los D1R como los D5R co-expresan en neuronas piramidales de la CPF, de la corteza premotora, cingulada y entorrinal, del hipocampo y del giro dentado (Huang et al., 1992; Smiley et al., 1994; Bergson et al., 1995a; Bergson et al., 1995b). El análisis con microscopía electrónica demuestra que tanto en la CPF como en el hipocampo D1R y D5R se localizan tanto en la pre como en la post-sinápsis (Smiley et al., 1994; Bergson et al., 1995a). En el núcleo caudado, el D1R y el D5R co-localizan en las interneuronas gabaérgicas, mientras que solo se encontró D1R en la neuronas piramidales de la sustancia nigra (*pars reticulata*) (Levey et al., 1993; Bergson et al., 1995b; Hersch et al., 1995).

Por otro lado, se ha detectado la presencia del D2R en las neuronas gabaérgicas del núcleo accumbens que co-expresan encéfalinas (Le Moine et al., 1990; Le Moine and Bloch, 1995), así como también en aquellas de la misma región que expresan neurotensina (Diaz et al., 1994). En la CPF, se ha reportado la presencia de receptores del “tipo D1” y del “tipo D2” en células piramidales glutamatérgicas y no piramidales gabaérgicas (Goldman-Rakic et al., 1989; Sesack et al., 1995; Bergson et al., 2003).

Sin embargo, a pesar de los numerosos estudios realizados por distintos investigadores y los diferentes abordajes experimentales utilizados por Missale y colaboradores (Missale et al., 1998), el estudio de la distribución, el patrón de expresión y la localización celular de los diferentes subtipos de receptores dopaminérgicos ha sido una tarea muy difícil. Los bajos niveles de expresión que presentan algunos subtipos de receptores y el alto grado de homología en la secuencia que presentan otros, ha hecho dificultosa la obtención de resultados confiables. Es por ello que aún existe controversia acerca de si las subfamilias de receptores se expresan conjuntamente en la misma célula o en poblaciones celulares diferentes (Vincent et al., 1993, , 1995).

Por ser de gran interés en esta tesis, la expresión y la localización del D4R se abordarán en forma mas detallada en la sección siguiente.

Propiedades farmacológicas

A pesar de ser los receptores dopaminérgicos mas ampliamente distribuidos, los D1R muestran una afinidad relativamente baja por la dopamina con una constante de inhibición (K_i) de 2 μ M. Los fármacos que activan de manera selectiva al receptor son el SKF-38393 (agonista parcial, K_i 150 nM) y el SKF-81297, en tanto que el fármaco SCH- 23390 es un antagonista selectivo con muy alta afinidad (K_i 0.3 nM) por el receptor (Clark and White, 1987; Missale et al., 1998). Por otro lado, las características farmacológicas del D5R son similares a las reportadas para el D1R salvo por el hecho particular de que el D5R posee 3 veces mayor afinidad por la DA que el D1R (Missale et al., 1998). La alta afinidad de los receptores del “tipo 1” para el antagonista SCH-23390 ha permitido su uso en la forma tritiada ($[^3H]$ SCH 23390), de gran utilidad para la identificación de los receptores de esta subfamilia.

Dentro de la subfamilia de los receptores de “tipo D2”, el D3R es el receptor que mas afinidad muestra por DA (K_i 30 nM), luego le sigue el D4R (K_i 450 nM) y por último, con una muy baja afinidad, sigue el D2R (K_i 2 M). Las características más sobresalientes de los receptores de esta subfamilia consisten en una alta afinidad por las butirofenonas (espiperona, haloperidol), las fenotiazinas (clorpromazina) y las benzamidas sustituidas (raclopride, sulpirida y nemonapride) y una baja afinidad por las benzacepinas (SCH 23390, SKF 38393). El receptor D4 presenta la particularidad de tener una menor afinidad por la mayoría de los antagonistas dopaminérgicos. Sin embargo, revela una afinidad 10 veces superior por el neuroléptico atípico clozapina lo que generó un gran interés por sus posibles implicaciones fisiopatológicas y terapéuticas (Van Tol et al., 1991).

Un agonista con alta afinidad por esta subfamilia es el quinpirole, siendo su afinidad por el subtipo D3R y D4R muy similar y mayor que para el D2R.

Debido a la alta homología de secuencia existente entre los receptores dopaminérgicos dentro de cada subfamilia, es frecuente que presenten propiedades

farmacológicas similares, particularmente porque poseen gran similitud en los sitios involucrados en la unión del ligando. A pesar de que se ha logrado diseñar ciertas drogas que presentan afinidades más altas por algún subtipo de receptor, en la mayoría de los casos la selectividad no es absoluta. Debido a este inconveniente, cobran una especial relevancia los modelos de animales con mutaciones nulas para un receptor dopaminérgico determinado cuyo análisis comportamental o neurofisiológico permite inferir las funciones específicas del receptor eliminado.

EL RECEPTOR DOPAMINÉRGICO D4.

Localización

Estudios de la localización del D4R demuestran un alto nivel de expresión en la CPF medial de los mamíferos y un nivel menor de expresión en mesencéfalo, hipotálamo y amígdala, áreas que, al igual que la CPF, se encuentran invadidas por las fibras dopaminérgicas provenientes del área tegmental ventral (Van Tol et al., 1991). La utilización de anticuerpos contra el D4R en ratas evidenció una baja expresión del receptor en el tálamo, globo pálido, hipocampo y cuerpo estriado (Ariano et al., 1997) (Fig.6). Asimismo, en primates, el empleo de anticuerpos permitió determinar su localización celular específica en interneuronas gabaérgicas y en neuronas piramidales glutamatérgicas de la CPF (Mrzljak et al., 1996). Con todos los métodos utilizados, tanto en roedores como en primates, la expresión del receptor en la CPF resultó evidente. Sin embargo, existe cierta controversia acerca de su expresión putativa en los ganglios basales, particularmente en el cuerpo estriado (o caudado/putamen). Seeman y colaboradores 1993 (Seeman et al., 1993) reportaron que solo el 10% de los receptores “tipo D2” presentes en el estriado, pertenecen al subtipo D4R. De la misma manera, utilizando ligandos marcados radioactivamente e inmunodetección otros autores reportaron la presencia del D4R en el estriado de ratas y humanos (Defagot et al., 1997; Tarazi et al., 1997; Rivera et al., 2002).

Recientemente, la utilización de un ratón transgénico que expresa la proteína verde fluorescente (EGFP) bajo el control transcripcional del gen del D4R, permitió estudiar de una manera más confiable el patrón de expresión del D4R en el cerebro de ratas (Noain et

al., 2006). Los resultados de ese trabajo corroboran la expresión preferencial del D4R en la CPF, sin embargo, reportan la ausencia total del mismo en el cuerpo estriado.

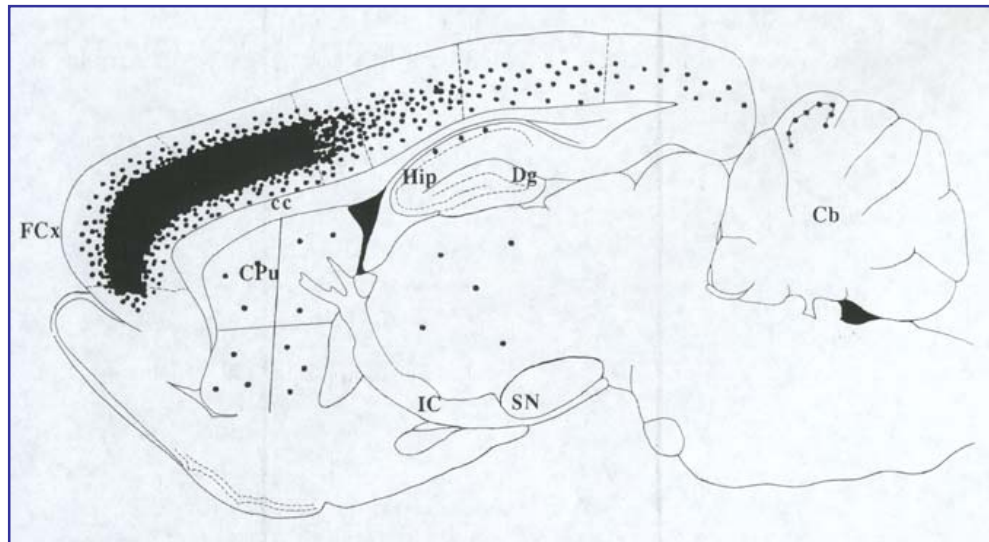


Figura 6: Distribución de la proteína D4R en la rata. En la figura se observa en forma esquemática la localización del receptor D4 concentrada principalmente en la corteza prefrontal con una presencia importante en las diferentes capas corticales. Se observan cantidades menores de la proteína en el tálamo, hipotálamo y cerebelo como así también en el caudado /putamen (Tomado de (Ariano et al., 1997)

Polimorfismos del D4R

Por sus características farmacológicas particulares, y su singular afinidad por el antipsicótico clozapina (Van Tol et al., 1991), el D4R ha sido considerado desde su clonación, como blanco terapéutico de los antipsicóticos atípicos, es decir aquellas drogas que mejoran los síntomas de las psicosis sin generar efectos adversos a nivel del sistema extrapiramidal. El gen del D4R humano (*Drd4*) comparte una alta homología de secuencia con el gen de la rata (73%), y con el gen del ratón (79%) (Fishburn et al., 1995). Sin embargo, la mayor divergencia entre los genes de los D4R de humano y de ratón se encuentra dentro de la región que codifica para el tercer dominio intracitoplasmático donde solo existe un 50% de homología de aminoácidos (Fishburn et al., 1995).

La organización genómica del D4R, que es similar entre el humano, la rata y el ratón, consiste en 3 intrones y 4 exones (Fig.7). En la población humana, el gen del D4R presenta una cantidad inusual de polimorfismos, tanto en su región codificante como en las

secuencias promotoras (Fig.7 y 8). El polimorfismo más significativo se ubica en el tercer exón y consiste en una secuencia de 48 pares de bases (16 aminoácidos) que puede presentarse en un número variable de repeticiones en tándem (VNTR). Esta secuencia puede estar repetida desde 2 a 11 veces, dando lugar a variaciones en la longitud del tercer dominio intracitoplasmático de la proteína del D4R (D4.2 a D4.11) (Fig.8) (Van Tol et al., 1992). Además, existen 18 secuencias diferentes de 16 aminoácidos, que pueden variar en cuanto al orden de aparición. Las diferentes combinatorias entre las secuencias repetidas y el orden de aparición generan un elevado número de haplotipos diferentes (Fig.7). Hasta el momento se han descrito al menos 27 de ellos (Lichter et al., 1993; Asghari et al., 1994).

Por otro lado, la frecuencia de ocurrencia de las variantes polimórficas no es homogénea dentro de la población humana. El alelo denominado D4.4 (que contiene 4 repeticiones) es predominante encontrándose en aproximadamente un 60% de la población humana mundial. El segundo alelo más frecuente es el D4.7 y se encuentra en aproximadamente un 14% de la población mientras que, el D4.2 y otras variantes que contienen hasta 10 repeticiones son raras y se encuentran en menos del 10% de la población (Chang et al., 1996)

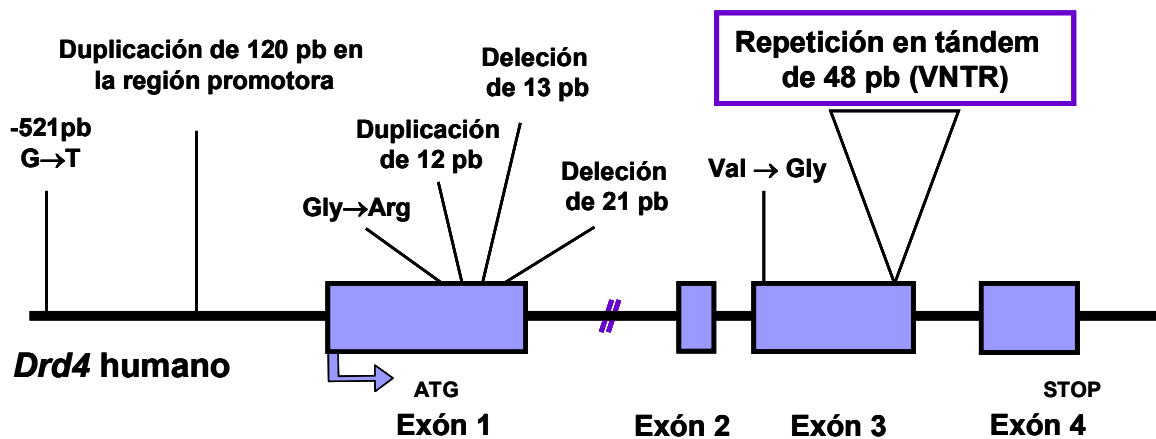


Figura 7. Estructura genómica del D4R humano. El gen consta de 4 exones y 3 intrones, en una unidad transcripcional de 4 kb. En la figura se indican los sitios que presentan polimorfismos en el gen humano. Los cambios en la región no codificante afectan los niveles de expresión del gen. La delección de 13 pb en el primer exón produce un corrimiento en el marco de lectura dando lugar a una proteína no funcional. Los otros cambios en el exón 1 afectan la longitud del extremo amino terminal y del primer segmento transmembrana. En el tercer exón, la sustitución Val → Gly afecta la unión de la dopamina, y el número de repeticiones en tándem de

la secuencia de 48 pb altera la longitud del tercer dominio intracitoplasmático y posiblemente afectaría la transducción de la señal intracelular.

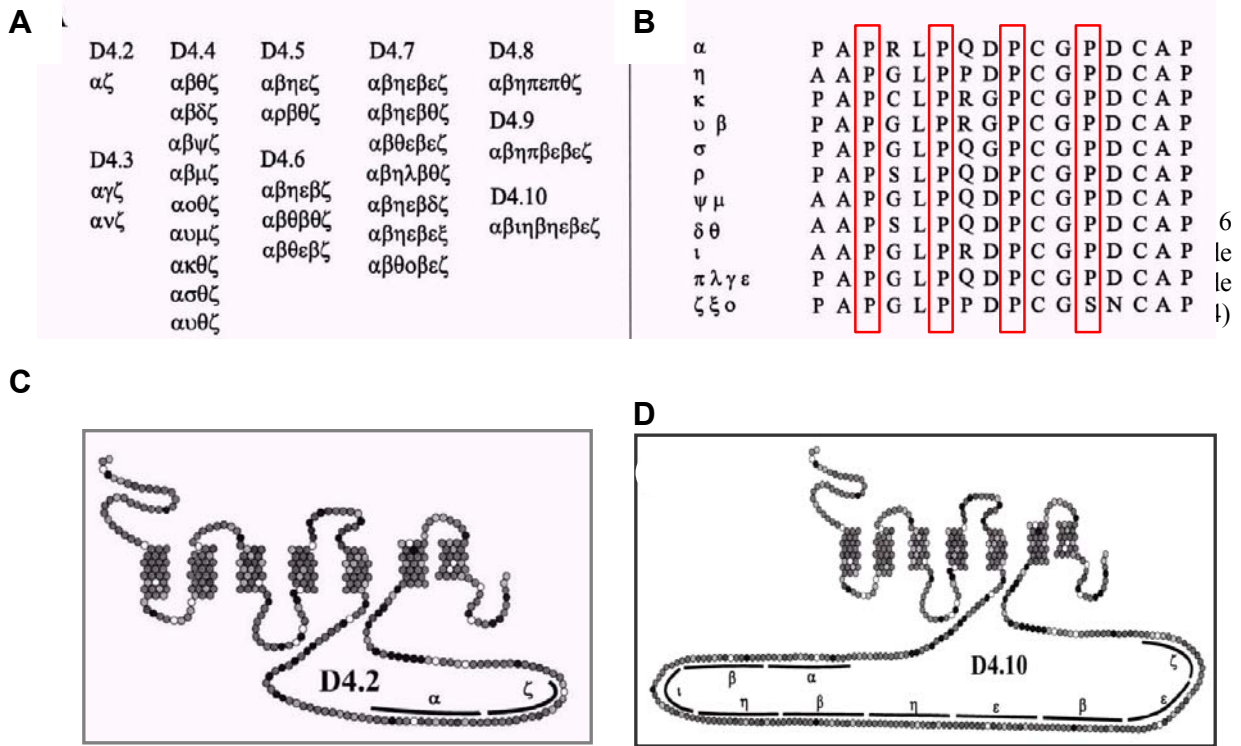


Figura 7. Variantes polimórficas del D4R humano en el tercer dominio intracitoplasmático.
 El D4R presenta un número variable de repeticiones en tándem de una secuencia de 48 pares de bases (16 aminoácidos). En A se muestran los distintos haplotipos descriptos. En B se indica la secuencia aminoacídica de cada una de las repeticiones. La figura C muestra un esquema del receptor D4, con 2 repeticiones (D4.2) y la figura D corresponde a la variante polimórfica de 10 repeticiones (D4.10) Tomado y modificado de (Jovanovic et al., 1999)

Papel funcional del D4R

Se ha reportado que diferentes variantes polimórficas de los hD4R muestran afinidades distintas por el antipsicótico clásico clozapina (Asghari et al., 1994). Además, la estimulación de la actividad adenilato ciclasa inducida por dopamina mediada por receptores D4.2 y D4.4 es 3 veces más potente que la mediada por los D4.7 (Asghari et al., 1995). Recientemente se ha demostrado que las variantes polimórficas presentan diferencias en sus niveles de expresión génica, hecho que podría tener consecuencias directas sobre la actividad del receptor (Schoots and Van Tol, 2003) propiedades farmacológicas y funcionales de los diversos subtipos de hD4R que resultan de la heterogeneidad estructural del tercer dominio intracitoplasmático aún no han podido ser claramente establecidas.

Debido a su alta afinidad por el antipsicótico clozapina, el D4R ha sido objeto de profundo estudio en los últimos diez años. La mayoría de los trabajos publicados hasta el momento intentan correlacionar en forma directa la expresión de alguna variante polimórfica del D4R con enfermedades psiquiátricas tales como la esquizofrenia o el déficit de atención e hiperactividad (ADHD). La evidencia mas consistente reportada hasta el momento proviene de numerosos estudios realizados independientemente que postulan una mayor prevalencia de la variante D4.7 en los pacientes con ADHD, respecto a la población normal (LaHoste et al., 1996; Swanson et al., 1998; Faraone et al., 1999). Sin embargo, pesar de la gran cantidad de trabajos publicados hasta el momento, aun no existen suficientes evidencias para establecer una clara asociación entre las variantes polimórficas del gen y la predisposición a alguna patología psiquiátrica (Daniels et al., 1994; Kohn et al., 1997).

Actualmente existe muy poca información en la bibliografía acerca del rol fisiológico del D4R en el sistema nervioso central. En células granulares del cerebelo se demostró que el D4R inhibe los canales de calcio tipo L (Mei et al., 1995). Asimismo, expresando el D4R en ovocitos de *Xenopus laevis* se demostró que la activación del receptor inhibe los canales de potasio voltaje dependientes, mientras que, de manera inversa, activa los canales de potasio acoplados a proteína G (GirK) (Werner et al., 1996).

Por otro lado, se ha estudiado la función del D4R en neuronas piramidales de la CPF de ratones portadores de una mutación nula para ese gen (Rubinstein et al., 2001). Los resultados demostraron un aumento de la excitabilidad cortical en estos ratones, evidenciando un rol inhibitorio del D4R. La hiperexcitabilidad encontrada en esas neuronas se debería a la incapacidad de la DA de ejercer su acción inhibitoria a través del D4R.

En el núcleo supraóptico, se han reportado efectos inhibitorios mediados directamente por la activación del D4R sobre la liberación de glutamato (Price and Pittman, 2000) y sobre la liberación de GABA (Azdad et al., 2003). Mas recientemente Wang y colaboradores (Wang et al., 2002) demostraron que la activación del D4R disminuye la actividad de los receptores postsinápticos GABA_A de las neuronas piramidales de la CPF. Esta modulación sobre la corriente gabaérgica se produce a través de la regulación directa del D4R sobre la proteína Yotiao, una proteína que sirve de anclaje para el complejo de señalización proteína quinasa A/ proteína fosfatasa 1 (PKA/PP1). Este complejo regula el estado de fosforilación de los receptores GABA_A. Asimismo, en las mismas neuronas

piramidales de CPF, Wang y colaboradores (Wang et al., 2003) reportaron una disminución de la corriente glutamatérgica mediada por receptores NMDA cuando el D4R es activado. Esta disminución observada involucra un mecanismo de inhibición de PKA.

OBJETIVOS

1. Analizar el rol del D4R en la modulación de la excitabilidad neuronal, caracterizando los efectos de dopamina sobre las propiedades intrínsecas de las neuronas piramidales de la lámina V (NPVL) de la corteza prefrontal de ratón.
2. Caracterizar las propiedades fisiológicas y farmacológicas de los subtipos más frecuentes del D4R humano mediante la co-expresión de las variantes D4.2, D4.4 y D4.7, con canales de potasio regulados por proteína G del tipo GIRK1, en ovocitos de *Xenopus laevis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. EXPRESIÓN DE RECEPTORES Y REGISTRO EN OVOCITOS DE *Xenopus laevis*

Las propiedades farmacológicas y funcionales de las variantes polimórficas de los hD4R, se estudiaron mediante la expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus Laevis* y el registro de corrientes iónicas con técnicas de electrofisiología. La expresión de los receptores estudiados y del canal de potasio se realizó mediante la inyección de ovocitos con soluciones de distintos ARN codificantes. Estos ARN se obtuvieron, a su vez, de la transcripción *in vitro* de templados de ADN copia (ADNc). A continuación se presentan detalladamente los procedimientos utilizados.

1.1 Ranas y ovocitos:

Los ovocitos utilizados fueron extraídos de ranas hembras de uña africanas de la especie *Xenopus laevis* provistas por Xenopus One (Ann Arbor, MI o Nasco, Modesto, CA, U.S.A.). Las ranas, almacenadas de a pares en peceras conteniendo agua limpia libre de cloro, se alimentaron una vez a la semana con hígado de vaca. Las mismas, fueron mantenidas en un ambiente con temperatura controlada (18- 20° C), y un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (7:00 AM-7:00 PM).

1.2 Preparación de los templados de ADNc y transcripción *in vitro* de los ARN:

Se utilizaron las secuencias completas de ADNc de tres variantes polimórficas del hD4R: D4.2 ($\alpha\xi$), D4.4 ($\alpha\beta\theta\xi$) y D4.7 ($\alpha\beta\eta\epsilon\beta\epsilon\xi$) (los caracteres griegos se utilizan para definir el tipo de repetición en tandem presente en la estructura proteica) (Jovanovic et al., 1999) y del canal de potasio GIRK1 (Kir3.1), subclonadas en plásmidos (pcDNA3, Invitrogen) aptos para realizar la reacción de transcripción *in vitro*. Los plásmidos que codifican para las diferentes variantes polimórficas del hD4R y para el canal de potasio

GIRK1, fueron generosamente provistos por el Dr. Hubert H. Van Tol y por el Dr. Eduardo Perozo respectivamente.

Para amplificar el ADNc plasmídico, cada una de las construcciones se propagaron en la cepa bacteriana DH5 α y el ADN plasmídico se obtuvo mediante una purificación estándar (miniprep) utilizando columnas específicas para ello (GFX-PCR DNA and Gel Band Purification Kit, Amersham, Biosciences, NJ, USA). Posteriormente, los plásmidos con cada inserto se linealizaron con las siguientes enzimas de restricción: las tres variantes del hD4, con Hind III y, GIRK1, con EcoRI.

El ARN (sentido) de cada una de las variantes del receptor y del canal de K⁺ se sintetizó *in vitro* utilizando para ello, el kit de transcripción T7 de RiboMAX Large Scale RNA Production System (Promega). El ARN sintetizado se purificó en columnas específicas para ARN (Rneasy MiniKit, Qiagen, Valencia, CA, USA), se alicuotó (0.2-0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) en agua libre de RNasas y DNasas (grado biología molecular, Ambion, Austin, TX, USA) y fue congelado a -70°C hasta el momento de su utilización.

Para chequear la integridad del ARN obtenido, se corrió una alícuota en un gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio por no más de 30 minutos en hielo, para evitar su degradación por RNasas. La determinación de la cantidad de ARN sintetizado se realizó mediante la medición de la absorbancia de luz (longitud de onda 240nm) en espectrofotómetro.

1.3 Inyección de ovocitos:

Ranas hembras, de la especie *Xenopus laevis* se anestesiaron añadiendo al agua de las peceras éster-etil-3-aminobenzoato al 1% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). A través de una pequeña incisión abdominal (1cm aproximadamente), se extrajeron varios pedazos de ovario con gran cantidad de ovocitos cada uno (Fig.8). Para disgregar los ovocitos, los fragmentos de ovario se trataron durante 30 a 40 minutos con una solución conteniendo 0.8 mg/ml de colagenasa tipo IA (Worthington, Freehold, NJ, USA) diluída en una solución salina sin Ca²⁺ (en mM: 96 NaCl, 2 KCl, 5 HEPES, 1.8 MgCl₂, pH 7.5). Para detener el tratamiento enzimático se lavó repetidamente (8 a 10 veces) con la solución salina sin Ca²⁺. Posteriormente al tratamiento enzimático, se seleccionaron los ovocitos maduros

(estadios V y VI) y se separaron de a uno librándolos de restos de tejido con la ayuda de pinzas de disección bajo lupa (12x).

Tal como se muestra en la Figura 1, los ovocitos presentan un patrón de pigmentación particular. Una mitad es amarillenta (“hemisferio vegetal”) y la otra oscura (“hemisferio animal”). La integridad en la separación de los pigmentos se utilizó como criterio de viabilidad de los ovocitos.

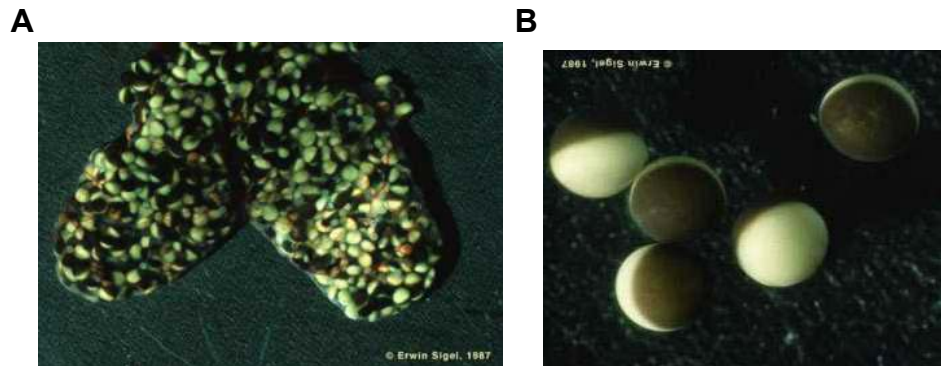


Figura 8: Ovocitos de *Xenopus laevis*. A) En la foto se muestra un fragmento de ovario extraído quirúrgicamente por incisión abdominal de rana *Xenopus laevis*. B) Detalle de la pigmentación diferencial de los ovocitos.

Finalmente, los ovocitos se mantuvieron en cultivo en viales de vidrio a 17°C, separados en grupos de entre 20 a 30, en una solución Barth’s con antibiótico (en mM: 88 NaCl; 0.33 Ca(NO₃)₂; 0.41 CaCl₂; 1.0 KCl; 0.82 MgSO₄; 2.4 NaHCO₃; 10 HEPES; pH 7.4 ajustado con NaOH y gentamicina (Sigma) 1.0mg/ml).

El día posterior a la defoliculación enzimática, cada ovocito fue inyectado manualmente con un microinyector (Drummond Sci. Co., Broomall, PA, USA) conteniendo 50nl de una mezcla de 5-10 ng de ARNs de D4.2 (αξ), D4.4 (αβθξ) ó D4.7 (αβηεβξξ) más otros 5-10 ng de ARN de GIRK1.

El microinyector posee un émbolo sobre el cual se montan pipetas muy finas de vidrio. Las pipetas se prepararon con capilares (Drummond) utilizando un estirador de pipetas PB-7 (Narishige Co. Ltd., Tokio, Japón). Luego se llenaron con aceite mineral (Sigma) y se cargaron por su punta con la solución de ARN. Una vez preparado el inyector, los ovocitos se colocaron en cápsulas de Petri de 35mm. de diámetro y cuyo fondo posee una membrana de polietileno con pocillos que limitan el movimiento de los ovocitos. Los ovocitos se dispusieron de manera tal que el polo vegetal (zona a inyectar, carente de

pigmento) quedara hacia arriba. La inyección se realizó en el citoplasma celular posicionando el microinyector con la ayuda de manipuladores mirando a través de la lupa (12 a 40X). Los ovocitos inyectados se mantuvieron en incubador a 17°C hasta el día de registro.

1.4 Registros electrofisiológicos:

Luego de tres días de incubación posteriores a la inyección, cuando la expresión de los receptores en la membrana es máxima, los ovocitos se registraron individualmente utilizando la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos (FVDE). El equipamiento utilizado para realizar esta técnica consta de: una lupa con aumentos de 15 a 100X, una cámara de registro (donde va colocada la preparación) ubicada sobre una mesa anti-vibratoria, un sistema de perfusión continua de soluciones (10-20 ml/min) que funciona por gravedad y que esta acoplado a una bomba de succión con trampa de vacío. Iluminando constantemente la cámara registro, hay una fuente de luz con lámpara halógena y fibra óptica. Todo este equipamiento se encuentra dentro de una jaula de Faraday, construida para minimizar el ruido eléctrico y optimizar la detección y adquisición de señales. Por fuera de la jaula de Faraday se encuentra el conjunto de instrumentos de registro compuesto por un amplificador Axoclamp 2B (Axon Instruments, Union City, CA, USA), filtro de señal pasabajo y un sistema de adquisición y digitalización de señales eléctricas (Labmaster TL-1 DMA, Scientific solutions Inc, Solon, OH, USA). La cámara de registro está construida a partir de una placa de acrílico con una canaleta (en donde se coloca la preparación), que posee un orificio de entrada y de salida para la perfusión de solución. El orificio de salida está conectado a la bomba de succión. Los microelectrodos de registro se construyeron con vidrio de borosilicato (World Precision Instrument, New Haven, CT, USA) y con la ayuda del estirador de pipetas PB-7 (Narishige). Para realizar los registros, los microelectrodos se llenan con 3M KCl y además se les introduce un alambre de plata (Ag) previamente clorurado con lavandina pura durante 5min. De esta manera, el alambre se convierte en un electrodo Ag/AgCl que permite la reacción redox con la solución de KCl habilitando la continuidad eléctrica entre el amplificador y el microelectrodo de registro. Los dos microelectrodos se montaron sobre cabezales (preamplificadores) con ganancias de 0.1 y 1X

y éstos, a su vez, se conectaron al amplificador. Cada cabezal del amplificador está sostenido por un micromanipulador (Newport Co., City, CA, USA) que se utiliza para posicionar el electrodo. Para cerrar el circuito eléctrico del sistema, se utilizó un electrodo de plata clorurado sumergido en la solución que baña la cámara de registro.

Los ovocitos se colocaron en la cámara de registro. Los electrodos se apoyaron sobre su superficie y lentamente fueron bajándose hasta lograr el acceso al interior de la célula. Durante los primeros minutos del experimento, los ovocitos se perfundieron continuamente con solución conteniendo bajo K^+ : (en mM: 96 NaCl, 2 KCl, 1.8 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 5 HEPES, ajustado a pH 7.5 con NaOH). En bajo K^+ y fijando el potencial de membrana en -100mV, los canales de GIRK se encuentran activados pero la corriente iónica desarrollada es casi nula. En esta situación, la aplicación de una solución con alto contenido de K^+ : (en mM: 96 KCl, 2 NaCl, 1.8 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 5 HEPES, ajustado a pH 7.5 con KOH) provoca un aumento significativo de la corriente iónica mediada por los GIRK. Esta corriente, en las condiciones de nuestros experimentos, constituye la corriente basal. La aplicación subsiguiente de monoaminas a través del sistema de perfusión permite estudiar la modulación ejercida por los hD4R sobre la corriente iónica mediada por los GIRK (Fig.9).

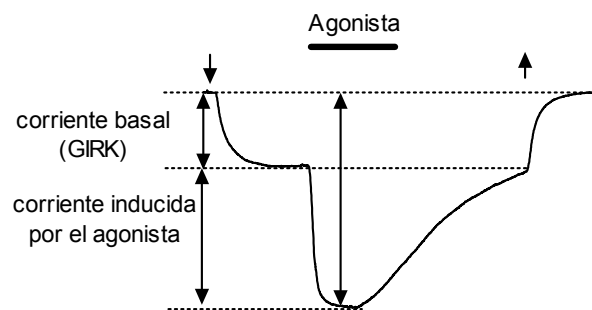


Figura 9: Medición de la corriente GIRK inducida por agonista. El esquema muestra un trazo representativo de la corriente GIRK evocada por alto K^+ (corriente basal) y por la adición de agonista. La amplitud total de la corriente, después de la perfusión con el agonista, se calcula como la corriente total, menos, la corriente basal. Las flechas indican el comienzo (↓) y el final (↑) de la perfusión con solución de alto K^+ , respectivamente.

Los registros electrofisiológicos se adquirieron con los programas Axotape y pClamp v.5.1 (Axon Instruments, Union City, CA, USA) y posteriormente se analizaron utilizando

los programas ClampFit v.8.1 (Axon Instruments, Union City, CA, USA) y GraphPad Prism v.4.0 (GraphPad software, Inc.).

Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (20-23°C).

2. TÉCNICA DE “PATCH CLAMP” EN RODAJAS DE CEREBRO

El estudio de la función del D4R en la modulación dopaminérgica de la corteza prefrontal fue estudiado utilizando la técnica de patch clamp en rodajas de cerebro. A continuación se detallan los procedimientos técnicos y materiales utilizados.

2.1 Ratones salvajes y mutantes nulos para D4R:

Para los experimentos ilustrados en el Capítulo I, se utilizaron ratones de la cepa de exocria CF1 (Charles River, U.S.A). Tanto los ratones salvajes (D4R^{+/+}) como los mutantes nulos para el receptor dopaminérgico D4R (D4R^{-/-}), nacieron y se criaron en una sala exclusiva perteneciente al laboratorio del Dr. Marcelo Rubinstein en el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET). Esta sala está equipada con sistemas de ventilación permanente y control de la temperatura (entre los 19 y 23 °C). Los animales tuvieron libre acceso a la comida y agua.

Los ratones mutantes nulos para el D4R se generaron mediante recombinación homóloga (Rubinstein et al., 1997) y posteriormente fueron retrocruzados diez veces a la cepa CF1 (n=10). De esta forma se unificó la carga genética entre los animales salvajes y los mutantes (D4R^{+/+} y D4R^{-/-} respectivamente). Para los experimentos mencionados, se utilizaron solo los animales homocigotas para la mutación (*Drd4*^{+/+} y *Drd4*^{-/-}). Estos animales se obtuvieron mediante apareamientos de padres no consanguíneos heterocigotas para la mutación (*Drd4*^{-/+}).

Todos los animales utilizados en este trabajo fueron tratados minimizando el estrés y el dolor causado por su manipulación.

2.2. Genotipificación de los ratones mutantes:

Luego de sacrificar a los animales para hacer las rodajas de cerebro (ver abajo), se les seccionó parte de la cola (1cm aproximadamente). Estas secciones extraídas fueron debidamente identificadas y congeladas a -20°C para ser utilizadas con posterioridad en la genotipificación de los animales. Todo el proceso de genotipificación se realizó en el laboratorio del Dr. Marcelo Rubinstein.

2.2.1 Extracción del DNA:

El protocolo utilizado para la identificación genotípica de los animales por PCR comienza con la extracción del ADN genómico de los fragmentos de cola extraídos de cada ratón utilizado para los experimentos. Las secciones de cola, se incubaron a 55°C en la solución de extracción (en mM: 50 Tris-HCl, 100 EDTA, SDS 0.5% y 0.5 mg/ml de proteinasa K, pH 8) durante 12-14 horas con agitación constante. Posteriormente el producto digerido se precipitó a 14.000 r.p.m durante 5 minutos para separar los fragmentos no degradados. Las proteínas del sobrenadante se eliminaron mediante una extracción con fenol-cloroformo-isoamílico (24-24-2 ml) saturado en buffer Tris- pH 8 y luego otra extracción con cloroformo-isoamílico (24-1 ml) para eliminar los restos de fenol. Finalmente, el ADN se precipitó utilizando 0.7 volúmenes de isopropanol y centrifugando a 14.000 r.p.m durante 10 minutos. El precipitado se enjuagó con etanol frío al 70% para eliminar los restos de sales, y, luego de secarse 1 hora, se resuspendió en 100 µl de buffer TE (en mM: 10 Tris, 1 EDTA, pH 8). El contenido de ADN genómico se determinó mediante absorbancia de la luz UV en un espectrofotómetro (DNA-RNA calculador, GeneQuant, Pharmacia). Las muestras fueron diluidas con buffer TE a una concentración final de 200ng/µl.

2.2.2 Genotipificación por PCR

Para la amplificación mediante la polimerización en cadena (PCR) se utilizaron aproximadamente 200ng de ADN genómico en un volumen de 1 µl. A este volumen se le

adicionaron 9 μ l de una mezcla de reacción conteniendo la enzima de polimerización Taq (0.25 unidades), los adaptadores (2.5 μ M), la solución de buffer comercial 1X (Buffer IDAHO Med. Mg^{++} 2 mM) y los desoxinucleótidos (200 μ M). Los adaptadores utilizados, denominados 110, 111 y 112, fueron diseñados especialmente para diferenciar el alelo salvaje del mutante (**110**: 5'-GCC CGG TTC TTT TTG TCA AG- 3'// **111**: 5'- CAT GGA CGT CAT GCT GTG CA-3'// **112**: 5'-CGG ACG ACT AGA CCA CAT AG- 3'). Las reacciones de PCR se realizaron en una termo-cicladora de capilares (IDAHO, USA) con el siguiente protocolo: una etapa inicial de desnaturalización a 94°C durante 4 minutos.; seguido de 35 ciclos de amplificación con un período de desnaturalización a 94°C durante 10 segundos, otro de apareo de los adaptadores a 60°C durante 10 segundos y amplificación a 72°C por 30 segundos; una vez terminados los ciclos, se continuó con una etapa de amplificación a 72°C por 4 minutos. Finalmente los fragmentos amplificados se observaron en un gel de agarosa 1.2% en TBE 0.5X (en mM: 45 Tris-Borato y 1 EDTA). La amplificación del alelo salvaje genera una banda de 300pb, en tanto que el alelo mutante produce una banda de 1.4Kb.

2.3 Obtención de rodajas de cerebro:

Ratones salvajes y mutantes nulos ($D4R^{+/+}$ y $D4R^{-/-}$ respectivamente) se anestesiaron con Metofano o Halotano y se sacrificaron por tracción medular. Se aisló quirúrgicamente el cerebro entero y fue transferido a un vaso de precipitado conteniendo una solución de buffer bicarbonato fría modificada para el corte (BBS de corte) (en mM: 125 NaCl, 2.5 KCl, 0.5 $CaCl_2$, 2.5 $MgCl_2$, 1.25 NaH_2PO_4 , 26 $NaHCO_3$, 10 glucosa (pH 7.4, equilibrado en carbógeno= 95 % O_2 / 5 % CO_2). Posteriormente, con la ayuda de un bisturí, y siempre manteniendo el tejido sumergido en BBS de corte con temperatura cercana a 0°C, se realizó manualmente un corte coronal del tercio anterior de la neocorteza, obteniéndose un taco de que tejido conteniendo las áreas corticales denominadas prelímbica e infralímbica (Fig.10).

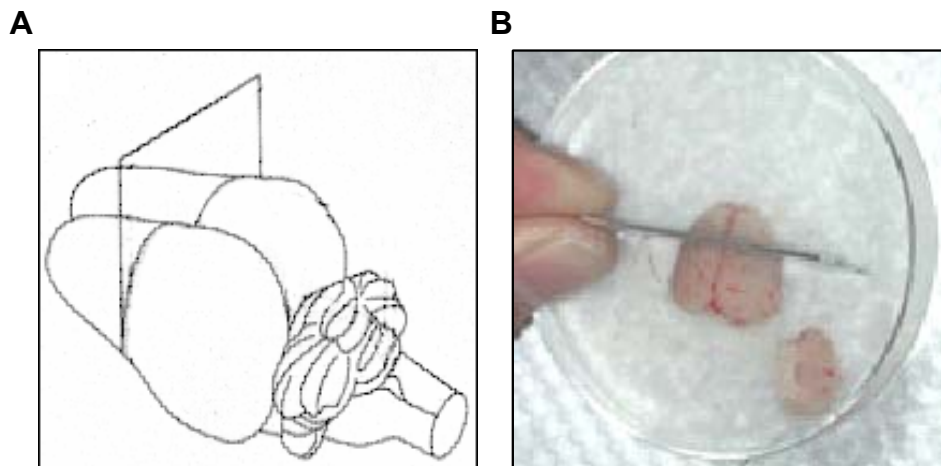


Figura 10: Disección del lóbulo frontal. A) La figura muestra un diagrama de un cerebro de ratón donde se señala el plano de corte a la altura del lóbulo frontal. B) fotografía de la disección del lóbulo frontal.

La corteza prefrontal medial (CPFm) de roedores se divide en cinco regiones, el área frontal 2 (Fr2), el área cingulada dorsal anterior (ACd), el área cingulada ventral anterior (ACv), el área prelímbica (PL) y el área infralímbica (IL) (Uylings y col., 2003). Se registraron neuronas piramidales de la lámina V (NPLV), ubicadas en las áreas Fr2, ACd, PL e IL como se muestra esquemáticamente en la Fig.11.

Luego de cortar el taco de tejido, con un pegamento a base de cianocrilato (La Gotita, Poxipol), se fijó el taco en la platina del vibrátomo (Vibratome 1000 plus, St. Louis, USA), cubriéndose inmediatamente con BBS de corte carbo-oxigenado. Se realizaron cortes coronales de 300 μm , desde los 0.3mm a los 1.8mm tomando como referencia el polo frontal.

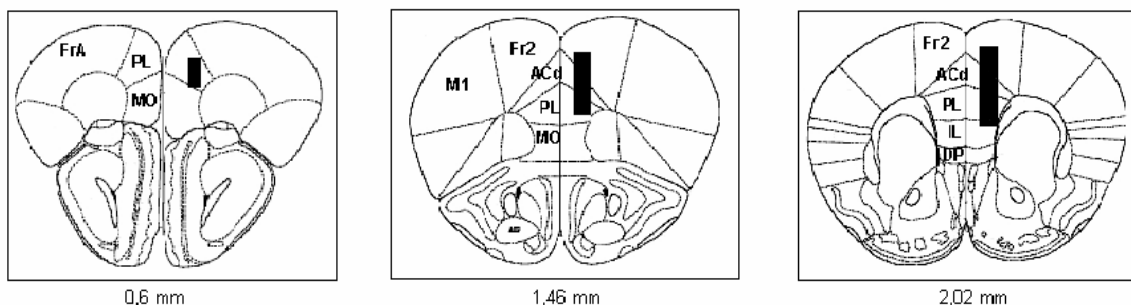


Figura 11: Diagramas de las regiones utilizadas para registrar. Las figuras muestran 3 diagramas equivalentes a los cortes coronales de las regiones de la CPFm utilizadas para registrar, desde la región más

anterior (izquierda) hasta la más posterior (derecha) con sus distancias (abajo en mm) desde el polo frontal. [Tomado y modificado de (Paxinos and Watson, 1998)]. Los recuadros negros esquematizan las áreas de registro. MO: corteza orbital medial, PL: corteza prelímbica, IL: área infralímbica, FrA: corteza frontal asociativa, M1: corteza motora primaria, ACd: corteza cingular anterior, Fr2: área frontal 2, DP: corteza dorsal peduncular.

Luego del corte, las rodajas se transfirieron, con la ayuda de una pipeta de vidrio de boca ancha, y se mantuvieron en BBS estándar (en mM: 125 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 1.25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 10 glucosa (pH 7.4, equilibrado en carbógeno= 95 % O₂ / 5 % CO₂) a temperatura ambiente (20-23 °C), en una vaso de precipitado adaptado con una malla plástica (Fig.12), para optimizar la recuperación de las rodajas y mejorar la llegada del carbógeno a las mismas.

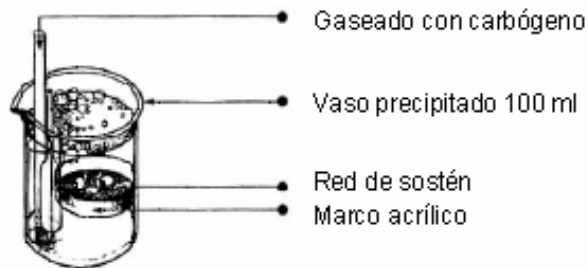


Figura 12: Diagrama del dispositivo de incubación de las rodajas. Vaso de incubación donde las rodajas se mantuvieron hasta el momento del registro. [Modificado de “Single channel recording”, Sakmann y Neher 1995].

2.4 Registros electrofisiológicos:

Luego de al menos 90 minutos de recuperación en el vaso de precipitado, las rodajas fueron traspasadas a una cámara de acrílico en donde se registró la actividad eléctrica de las neuronas piramidales de la lámina V de la corteza prefrontal (NPLV). El proceso de recuperación de las rodajas, permite que las neuronas dañadas irreversiblemente durante la disección se mueran, y solo se visualicen al microscopio aquellas células que están en condiciones de ser registradas.

El equipamiento necesario para llevar a cabo estos experimentos consta de: una cámara de acrílico en donde se coloca la preparación, que está montada en un microscopio directo modelo Axioskope FS, (Carl Zeiss, Alemania), equipado con un objetivo de inmersión en agua (63X), óptica de contraste de interferencia diferencial (DIC), un módulo de fluorescencia y una cámara de video con detección en el espectro infrarrojo (Newvicom, Hamamatsu Photonics, Japan).

El diseño de la cámara de registro, permite la llegada de un sistema de perfusión continua (1-2 ml/min) que funciona por gravedad y que está acoplado a una bomba de succión con trampa de vacío. Para manipular el electrodo de registro, se utiliza un micromanipulador piezoeléctrico Burleigh TS-5000-150 (Burleigh inc., USA), que, conjuntamente con la cámara de registro, esta montado sobre una mesa Gibraltar (Burleigh inc., USA). Esta mesa, a su vez, se encuentra fijada a otra mesa de mayor tamaño que es antivibratoria (TMC, Technical Manufacturing Corporation, MA, USA), adonde se encuentra también apoyado el microscopio. Con este diseño, cualquier vibración o movimiento que se produzca en la mesa antivibratoria o en el microscopio, no se transmite ni a la preparación, ni al micromanipulador, garantizando de la mejor manera, la continuidad de los registros.

Para aislar el sistema de interferencias y ruidos eléctricos la mesa antivibratoria se ubica dentro de una jaula de Faraday.

El sistema de adquisición de las señales eléctricas esta formado por un amplificador Axopatch 200B (Axon Instruments, Union City, CA, USA) y una computadora personal (Pentium IV) que posee una tarjeta de adquisición y digitalización Digidata 1200 (Axon Instruments, Union City, CA, USA). Los datos se digitalizaron *on line* a 4KHz para el modo fijación de voltaje o 10KHz para modo fijación de corriente. La señal fue filtrada a 2kHz en fijación de voltaje o 5kHz cuando se trabajó en el de modo fijación de corriente, con el filtro interno pasabajos del amplificador. También se utilizó un filtro digital (eliminador de ruidos Hum Bug) para filtrar interferencias de 50Hz y sus armónicos.

Para realizar los registros se prepararon micropipetas con vidrio de borosilicato (WPI, New Haven, USA) en un estirador de micropipetas vertical (Sutter P-30, Novato, USA), en dos pasos. La resistencia de las micropipetas osciló entre los 2.5 y 4 M Ω . Las micropipetas

fueron cargadas con soluciones (“intracelulares”) y se les introdujo además alambre de plata (Ag) previamente clorurado con lavandina pura durante 5min. Las soluciones intracelulares y las de perfusión (“extracelulares”) se modificaron de acuerdo al tipo de experimento realizado (ver sección 4). En algunos casos se cargaron además, con Lucifer-yellow, el cual dializa a la célula durante el registro y permite observar la morfología celular al microscopio de fluorescencia. En otros casos, se adicionó Neurobiotina (Vector Laboratories, Burlingame, USA) a la solución intracelular. La Neurobiotina, también dializa a la célula y posteriormente es revelada con técnicas de inmuno-histoquímica permitiendo la identificación de las neuronas registradas.

Las micropipetas se fijaron al cabezal (preamplificador) y este a su vez se conectó al amplificador. Desde el electrodo hasta fuera de la jaula de Faraday se conectó una tubuladura de plástico que permite la conexión externa con el interior del electrodo.

La técnica de patch-clamp permite realizar distintas configuraciones de registro. En nuestros experimentos se utilizó una configuración denominada de célula entera (“*whole cell patch clamp*”) que permite monitorear eléctricamente la actividad global de la neurona. Bajo esta configuración, y estimulando eléctricamente la neurona bajo el modo fijación de corriente, fueron registrados potenciales de acción y corrientes activadas por despolarización e hiperpolarización. Por otro lado, utilizando el modo fijación de voltaje, se registraron corrientes de K^+ activadas por hiperpolarización y corrientes sinápticas espontáneas gabaérgicas y glutamatérgicas. Para obtener la configuración mencionada, se apoyó el electrodo sobre la neurona con la asistencia de un micromanipulador, y se hizo succión de la membrana celular a través de una tubuladura que conecta al interior del electrodo. Esta maniobra permite la formación de un sello de alta resistencia entre la membrana plasmática y el vidrio de la micropipeta que se usa como electrodo. Como resultado de ello, disminuyen significativamente los niveles de ruido y aumenta la resolución del sistema para la detección de señales. Una vez formado el sello de alta resistencia (1 $G\Omega$ aproximadamente), se vuelve a succionar suavemente a través de la tubuladura, provocando la ruptura de la membrana celular que se encuentra en el interior de la micropipeta, permitiendo así, el acceso al interior de la célula. En esta configuración, la pipeta tiene continuidad eléctrica y espacial con el interior de la célula lo que permite que en pocos minutos la solución intracelular de la pipeta reemplace, por difusión, a la solución citoplasmática. Una vez establecida la configuración

célula entera se estimó el valor de resistencia en serie (R_s) que se mantuvo entre 20 y 30 $M\Omega$. En la mayoría de los experimentos realizados bajo el modo de fijación de voltaje, la R_s fue compensada entre un 60-70%. Los registros en los que R_s cambió más de un 20% respecto del valor inicial no fueron incluidos en el análisis. De igual manera, aquellas células en donde el potencial de reposo (V_m) varió más de un 15% fueron descartadas del análisis.

Los registros electrofisiológicos se adquirieron con el programa pClamp v.8.0 (Axon Instruments, Union City, CA, USA) y posteriormente se analizaron utilizando los programas ClampFit v.8.1 (Axon Instruments, Union City, CA, USA), MiniAnalysis (Synaptosoft, USA), GraphPad Prism v.4.0 (GraphPad software, Inc.) y Excel 2003 (Microsoft).

Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (23-25°C).

2.5 Inmunohistoquímica de rodajas de cerebro:

En los casos en donde se adicionó Neurobiotina en la solución intracelular, luego de finalizados los registros electrofisiológicos se retiró la micropipeta de patch de la célula y seguidamente se extrajo la rebanada cuidadosamente para preservar la integridad del tejido. Para fijarlo, se incubó la rebanada durante 12 horas en una solución de paraformaldehído 4 % en PBS (en mM: 137 NaCl, 2.7 KCl, 10 Na_2HPO_4 y 2 KH_2PO_4 , pH 7.4). A continuación, para atenuar las peroxidasas endógenas, se sumergió la rebanada durante 1 hora en H_2O_2 1% en KPBS (en mM: 16 K_2HPO_4 , 3.6 KH_2PO_4 y NaCl al 0.9%). Después de lavar (2 veces x 20 minutos en KPBS), se volvió a incubar la rebanada durante 2 horas con el complejo avidina- peroxidasa (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratorios, USA), en una dilución 1/1000, en Tritón X-100 0.3%. El complejo fue preparado a temperatura ambiente 2 horas previas a la incubación. Finalmente se lavó el tejido 20 minutos con KPBS y luego otros 20 minutos con TBS (en mM: 50 Tris-HCl, 150 NaCl, pH 7.2 a 7.6). Para la reacción de revelado, se sumergió la rebanada hasta desarrollar color, en una solución de 0.25 mg/ml de diaminobenzidina (DAB, Sigma) en TBS, conteniendo 0.03% H_2O_2 . La reacción fue detenida lavando la sección de tejido en KPBS. Luego de ser montada en portaobjetos, la rebanada se dejó secar al aire libre durante 12 horas y luego se deshidrató en una serie de alcoholes con concentraciones crecientes (35, 70, 95 y 100%) y xileno. El cubreobjetos fue

sellado utilizando *Permount* (Fisher, New Jersey, USA) y examinado con lentes de inmersión en aceite 100X.

Para el caso de células cargadas con Lucifer-yellow se tomaron fotografías directamente utilizando el mismo microscopio de registro. Este procedimiento se utilizó como criterio de identificación de las neuronas registradas.

3. ANÁLISIS DE DATOS

Los datos obtenidos se promediaron y se expresaron como media \pm error estándar de la media (ES). Para analizar los registros se utilizaron los programas GraphPad Prism v.4.0 (GraphPad software, Inc.) y Excel 2003 (Microsoft).

Las curvas dosis-respuesta presentadas en el Capítulo II, se obtuvieron ajustando los datos a la ecuación logística: $I/I_{\max} = A^{nH}/(A^{nH} + EC_{50}^{nH})$, en donde I, es el pico de corriente evocado por el agonista a la concentración A; I_{\max} , es la máxima respuesta (evocada por 100 nM de DA); EC_{50} es la concentración del agonista que evoca la mitad de la respuesta máxima y nH es el coeficiente de Hill.

Para las comparaciones entre dos grupos experimentales se utilizó la prueba *t* de Student. Para comparar más de dos grupos, se utilizó ANOVA de una o dos vías (según el caso particular), seguido por la prueba *a posteriori* HSD Tukey.

4. DROGAS Y SOLUCIONES UTILIZADAS

Todas las soluciones con drogas utilizadas fueron preparadas en el día del experimento. En algunos casos a partir de stocks concentrados (0.1M) y congelados a -20°C .

Para los experimentos realizados en ovocitos (Capítulo II) las monoaminas utilizadas (DA, NA y 5HT), así como también los agonistas y antagonistas, se diluyeron en la solución de alto K^{+} . Para los experimentos de patch clamp (Capítulo I) las drogas utilizadas fueron diluidas en la solución extracelular estándar (BBS) o en la solución intracelular según fuera necesario.

Algunas drogas fueron disueltas con DMSO, a una concentración máxima de 0.1% (V/V), con la cual no se encontraron alteraciones en las propiedades y respuestas de los ovocitos o células piramidales durante el tiempo que duró el registro. El pH de cada solución fue ajustado a 7.0-7.2.

A continuación se detalla el origen de las drogas y la composición de las soluciones utilizadas que no fueron mencionadas anteriormente en el texto:

4.1 Drogas

- **Dopamina:** Sigma Chemical Co., St. Louis, USA. Stock 10 mM en agua hexadestilada preparado el día del experimento.
- **Noradrenalina:** Sigma Chemical Co., St. Louis, USA. Stock 10 mM en agua hexadestilada preparado el día del experimento. Dilución en solución de alto K⁺.
- **Serotonina:** Sigma Chemical Co., St. Louis, USA. Stock 10 mM en agua hexadestilada preparado el día del experimento.
- **Quinpirole:** Sigma Chemical Co., St. Louis, USA. Stock 10 mM disuelto de DMSO el día del experimento.
- **PNU-101387:** Antagonista de alta afinidad por el D4R. Pharmacia & Upjon, MI, USA. Stock 100 mM disuelto en DMSO (congelado a -20°C por no más de dos semanas).
- **TTX:** (tetrodotoxina). Sigma Chemical Co; St. Louis, USA. Stock 20mM disuelto en agua (congelado a -20°C).
- **Bicuculina Methyodide:** Antagonista específico de los receptores de GABA_A. Sigma Chemical Co., St. Louis, USA. Stock 10 mM disuelto en agua hexadestilada. Almacenado por no más de 3 semanas a -20°C.
- **CNQX:** Antagonista específico de los receptores glutamatérgicos del tipo AMPA. Sigma Chemical Co., St. Louis, USA. Stock 10 mM disuelto en agua hexadestilada. Almacenado por no más de 3 semanas a -20°C.
- **APV:** Antagonista específico de los receptores de glutamatérgicos del tipo NMDA. Sigma Chemical Co., St. Louis, USA. Stock 10 mM disuelto en agua hexadestilada. Almacenado por no más de 3 semanas a -20°C.

4.2 Soluciones extracelulares de patch clamp:

El BBS utilizado para realizar los registros de patch clamp tiene la siguiente composición: NaCl 125mM, KCl 2,5mM, CaCl₂ 2mM, MgCl₂ 1mM, NaH₂PO₄ 1,25mM, NaHCO₃ 26mM y glucosa 10mM. Osmolaridad de 290 a 300mOsm, pH 7.3.

Durante los experimentos de fijación de corriente (evocación de potenciales de acción), se adicionó a esta solución, CNQX 10 μ M, APV 10 μ M y bicuculina 10 μ M.

4. Soluciones intracelulares de patch clamp:

Las soluciones intracelulares se prepararon, se alicuotaron de a 1 ml y se almacenaron (hasta 6 meses) a -70°C. Su composición varió de acuerdo al tipo de experimento realizado.

Para registros de potenciales de acción evocados: K-gluconato 120 mM, KCl 20 mM, HEPES 10 mM, EGTA 0,1 mM, MgCl₂ 2 mM, Na₂ATP 3 mM y NaGTP 0,3 mM. Se ajustó el pH a 7.3 con KOH.

CAPÍTULO I

Rol del receptor D4 dopaminérgico en el control de la excitabilidad de las neuronas piramidales de la corteza prefrontal

I.1.INTRODUCCIÓN

Para estudiar mas en detalle el rol del D4R, en esta parte del trabajo, nos propusimos caracterizar las propiedades pasivas y activas de las neuronas piramidales de la lamina V (NPLV) de la CPF de ratones salvajes, D4R^{+/+}, y de ratones mutantes nulos para el receptor (D4R^{-/-}). Asimismo analizamos los efectos de la DA en el control de la excitabilidad neuronal y la generación de potenciales de acción utilizando la técnica de patch clamp en rebanadas de cerebro en la configuración “célula entera”.

I.2 RESULTADOS

Identificación visual de las neuronas a registrar

Utilizando videomicroscopía infrarroja con contraste de interferencia diferencial, las neuronas a registrar fueron reconocidas visualmente por su morfología, tamaño y principalmente por la orientación de las dendritas apicales en la rebanada del tejido.

En algunos experimentos, las neuronas fueron marcadas con neurobiotina para confirmar post-registro, la morfología y ubicación correctas. Todas las neuronas marcadas con neurobiotina (n= 30) tuvieron la forma y ubicación de las NPLV de CPF, similares a las que se muestran en la Fig.1.1. No se encontraron diferencias morfológicas entre las neuronas provenientes de ratones salvajes o mutantes nulos para el D4R.

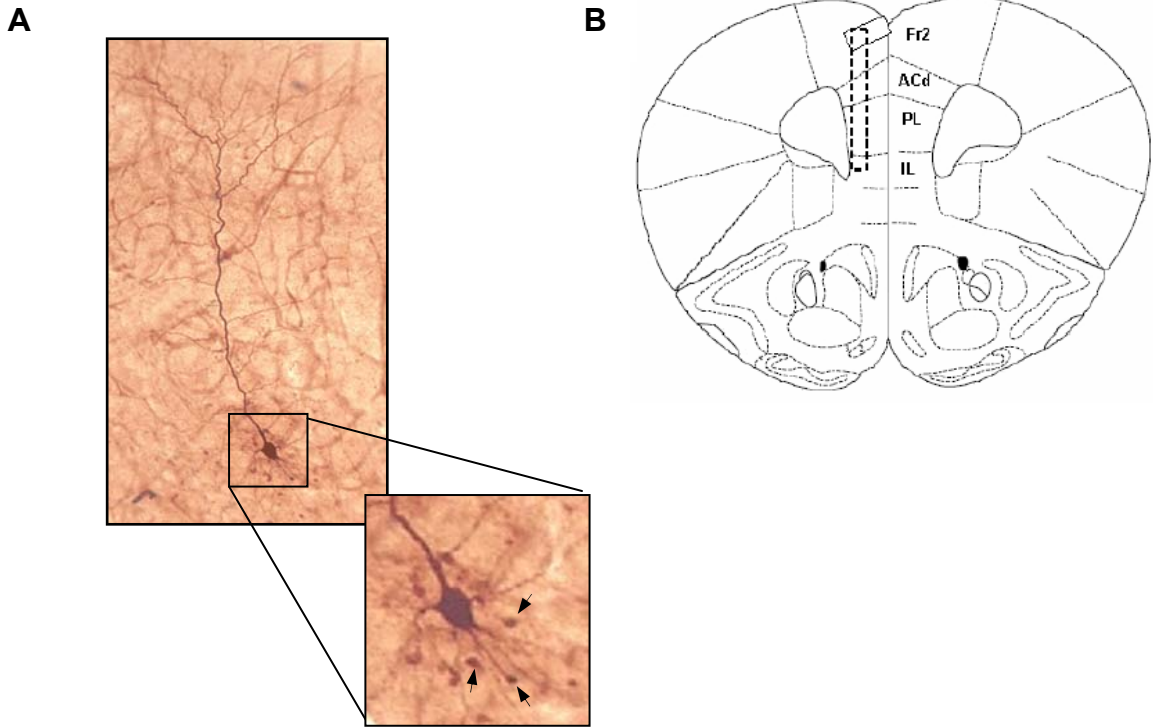


Figura 1.1: Neurona piramidal de la lámina V. A) Neurona piramidal de la CPF de ratón marcada con neurobiotina. Se distingue el soma con las dendritas basales (detalle) y la dendrita apical prominente apuntando hacia la pía madre. Cerca del soma se observan algunas dendritas basales seccionadas por el corte de la rebanada (flechas en el detalle). B) Diagrama de una sección coronal de CPF de ratón. El recuadro con línea cortada indica el área de registro [Tomado y modificado de (Paxinos and Watson, 1998)] Fr2: área frontal 2; ACd: corteza cingular anterior; PL: corteza prelímbica; IL: área infralímbica.

Caracterización de las propiedades pasivas y activas de las NPLV:

Comparación entre $D4^{+/+}$ y $D4^{-/-}$

Patrón de disparo de los potenciales de acción

Para caracterizar el patrón de disparo de potenciales de acción se utilizó la técnica de patch-clamp en la configuración "célula entera" y en el modo "fijación de corriente". A cada neurona se le aplicó un pulso rectangular de corriente supraumbra, de al menos 800 ms de duración, para evocar un tren de potenciales de acción. La amplitud del pulso se ajustó con cada célula de manera tal de obtener de entre 5 y 8 potenciales de acción (100- 200 pA). Un

total de 111 células, 63 neuronas provenientes de rebanadas de ratones salvajes $D4^{+/+}$, y 48 neuronas provenientes de rebanadas de ratones mutantes nulos $D4^{-/-}$, se clasificaron y agruparon en tres grupos (Fig.1.2) según las características del patrón de disparo previamente descritas para CPF de ratas (Yang et al., 1996): **RS**, **IB** e **IM** (del inglés "regular spiking", "intrinsically bursting" e "intermediate" respectivamente). Los porcentajes de las neuronas clasificadas se muestran en la Tabla I.

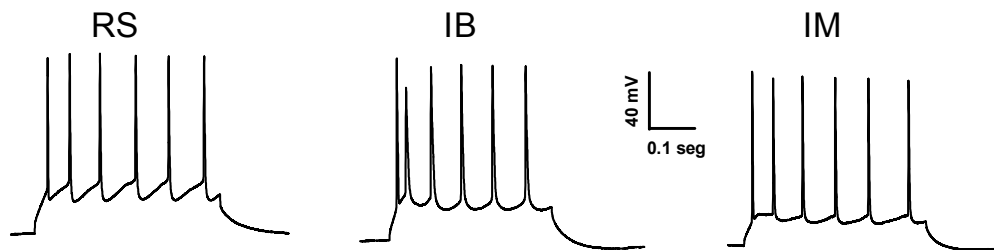


Figura 1.2. Patrones de disparo encontrados para las NPLV. Trazos representativos de los patrones de disparo encontrados en la lámina V de la CPF de ratón. Neurona de disparo regular (RS), neurona de disparo en ráfagas (IB) y neurona de disparo intermedio (IM).

I. Proporción encontradas patrón de	Patrón de disparo	Tabla de NPLV para cada disparo	
		$D4^{+/+}$ (n=63)	$D4^{-/-}$ (n=48)
	RS	42.8 %	52.3 %
	IB	9.5 %	8.3 %
	IM	47.6 %	39.5 %

Las neuronas se clasificaron y agruparon según su patrón de disparo y los resultados se expresaron como porcentaje del total de células estudiadas según fueran provenientes de animales salvajes o mutantes nulos para el D4R.

Debido a que las neuronas son reconocidas visualmente por su morfología piramidal, no era esperable encontrar patrones diferentes a los descriptos para neuronas piramidales. Sin embargo, se encontraron 3 neuronas (de un total aproximado de 250) con un patrón de

disparo rápido, correspondiente al tipo FS (del inglés "fast spiking") característico de interneuronas gabaérgicas (Yang et al., 1996) (Fig1.3) que no pudieron ser distinguidas del resto de las piramidales por su morfología particular. Ninguna de estas 3 neuronas fue incluida en el análisis.

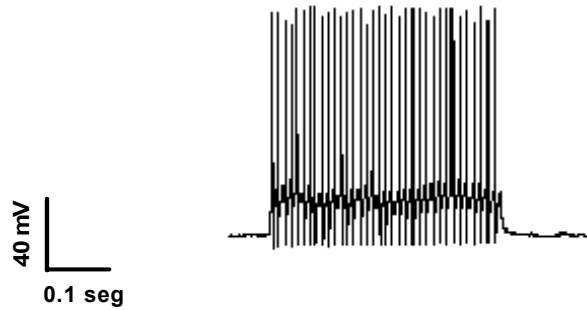


Figura 1.3: Neurona de disparo rápido. Trazo representativo mostrando el patrón de disparo característico de interneuronas gabaérgicas.

Después de clasificar las neuronas según el patrón de disparo, se realizó un análisis detallado de las propiedades de los potenciales de acción de cada fenotipo electrofisiológico encontrado, analizando la forma de la espiga y las propiedades eléctricas de la misma (ver Materiales y Métodos). Para el análisis se discriminó a las neuronas según fueran procedentes de un ratón $D4^{+/+}$ ó $D4^{-/-}$.

Neuronas de disparo regular (RS)

Se analizaron un total de 20 neuronas de disparo regular: diez (10) provenientes de rebanadas de animales $D4^{+/+}$ y diez (10) provenientes de rebanadas de animales $D4^{-/-}$. Luego se compararon los parámetros estudiados y no se encontraron diferencias significativas entre las células provenientes de animales de diferente genotipo (Tabla II).

Parámetros de las neurona RS	D4^{+/+} (n=10)	D4^{-/-} (n=10)
Voltaje de membrana (mV)	-64.2 ± 1.6	-64.9 ± 1.2
Resistencia de membrana (mΩ)	176.8 ± 19	180.2 ± 32
Amplitud de los PA (mV)	103.1 ± 1.9	104.2 ± 2.9
Ancho de los PA (a 20pA del umbral) (ms)	2.7 ± 0.21	2.9 ± 0.21
Ancho de los PA (a la mitad de la amplitud.)(ms)	1.8 ± 0.1	1.9 ± 0.1
Umbral de los PA (mV)	-42.8 ± 0.8	-42.4 ± 1.6
Tiempo de subida 10-90% (ms)	0.6 ± 0.03	0.6 ± 0.04
Tiempo de decaimiento 90-10% (ms)	2.5 ± 0.22	2.6 ± 0.25

Tabla II. Análisis de las propiedades generales de los potenciales de acción de de neuronas RS en rebanadas de CPF de ratones D4^{+/+} y D4^{-/-}

En todas las neuronas estudiadas, la relación corriente-voltaje fue lineal a potenciales entre -40 y -80 mV (Fig.1.4) correspondiéndose con el comportamiento típico de una neurona de disparo regular. A medida que se incrementó la amplitud del pulso de estimulación, se observó un incremento en la frecuencia de potenciales de acción evocados y también se hizo mas largo el intervalo entre espigas evocadas sucesivamente, lo que sugiere la existencia de mecanismos de adaptación. Las NPLV provenientes de animales D4^{+/+} o D4^{-/-} no mostraron diferencias en este fenómeno de adaptación.

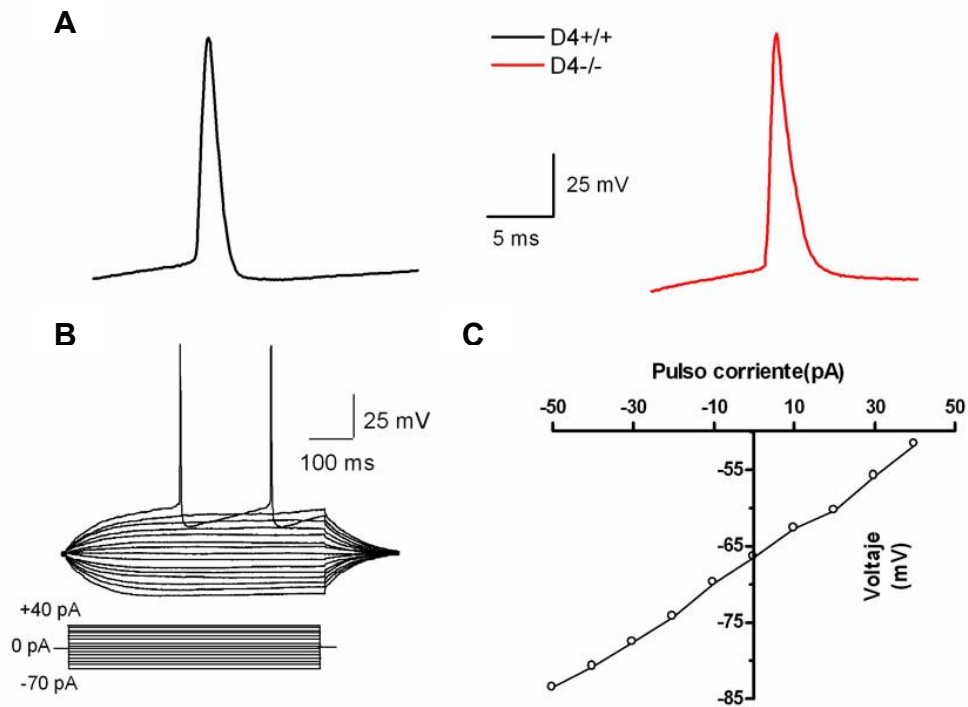


Figura 1.4: Características electrofisiológicas de las NPLV de disparo regular. A). Trazos representativos de potenciales de acción de neuronas RS provenientes de rebanadas de un ratón D4^{+/+} (izquierda) y de un ratón D4^{-/-} (derecha). B). Registro representativo en el modo fijación de corriente donde se observan los cambios del potencial de membrana de una neurona RS (D4^{+/+}) en respuesta a una serie de pulsos de corriente hiperpolarizante y despolarizante (protocolo: de -70pA a +40 pA con incrementos de a 10pA y una duración 800 ms).C) Relación voltaje-corriente (V-I) de respuestas evocadas en una neurona RS con un protocolo similar al descrito en la figura B.

Neuronas de disparo intermedio (IM)

Se analizaron un total de 20 neuronas de disparo intermedio: diez (10) provenientes de rebanadas de animales D4^{+/+} y diez (10) provenientes de rebanadas de animales D4^{-/-}. Se compararon los potenciales de membrana de las células registradas y se encontraron diferencias significativas entre los potenciales de membrana de neuronas provenientes de ratones D4^{+/+} y las provenientes de ratones D4^{-/-} (Student Test $p < 0.05$). En los demás parámetros estudiados, no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla III).

Tabla III. Análisis de las propiedades generales de los potenciales de acción de de neuronas IM en rebanadas de CPF de ratones D4^{+/+} y D4^{-/-}.

Parámetros de las neuronas IM	D4^{+/+} (n=10)	D4^{-/-} (n=10)
Voltaje de membrana (mV)	-61.9 ± 1.1	-67.5 ± 1.8 *
Resistencia de membrana (mΩ)	153.4 ± 20	146.4 ± 13.6
Amplitud de los PA (mV)	111.9 ± 1.9	112.3 ± 1.9
Ancho de los PA (a 20pA del umbral) (ms)	2.9 ± 0.2	2.9 ± 0.21
Ancho de los PA (a la mitad de la amplitud.)(ms)	1.8 ± 0.1	1.8 ± 0.11
Umbral de los PA (mV)	-45.0 ± 1.4	-44.3 ± 1.2
Tiempo de subida 10-90% (ms)	0.5 ± 0.03	0.6 ± 0.03
Tiempo de decaimiento 90-10% (ms)	2.7 ± 0.1	2.6 ± 0.2

*p<0.05 (Student t- Test).

En neuronas intermedias de la CPF de rata se ha descrito la presencia de una hiperpolarización rápida (fAHP) y de una hiperpolarización de longitud media (mAHP) que se producen después de cada potencial de acción. Asimismo, se ha caracterizado en estas mismas células, una pequeña (3-4mV) despolarización (DAP) que aparece entre medio de ambas hiperpolarizaciones después del primer potencial de acción, que disminuye a medida que aumenta el pulso depolarizante y la neurona responde evocando mayor cantidad de espigas (Yang et al., 1996). En la mayoría de las neuronas de disparo intermedio registradas en este trabajo, se observó la presencia de la DAP y de la mAHP, siendo la fAHP más difícil de visualizar. Si bien no se realizó un análisis cuantitativo de las amplitudes de las AHP, cualitativamente no se observaron diferencias entre las neuronas provenientes de animales salvajes o mutantes nulos para el D4R (Fig.1.5).

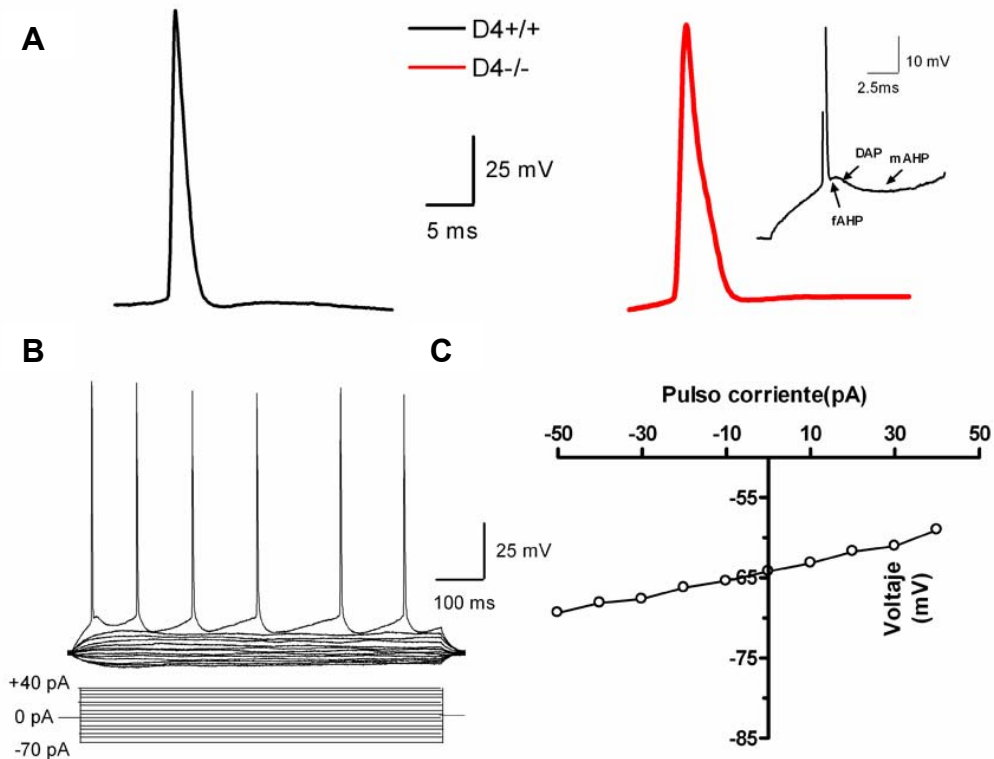


Figura 1.5: Características electrofisiológicas de las NPLV de disparo intermedio. A). Trazos representativos de potenciales de acción de neuronas IM provenientes de rebanadas de un ratón $D4^{+/+}$ (izquierda) y de un ratón $D4^{-/-}$ (derecha). Detalle: Trazo representativo mostrando la DAP, fAHP y mAHP. B). Registro representativo en el modo fijación de corriente donde se observan los cambios del potencial de membrana de una neurona IM ($D4^{+/+}$) en respuesta a una serie de pulsos de corriente hiperpolarizante y despolarizante (protocolo: de -70 pA a +40 pA con incrementos de a 10 pA y una duración 800 ms). C) Relación voltaje-corriente (V-I) de respuestas evocadas en una neurona IM ($D4^{+/+}$) con un protocolo similar al descrito en la figura B.

Neuronas de disparo en ráfagas (IB)

El disparo en ráfagas es el patrón menos frecuente en las condiciones en que realizamos nuestros experimentos, por lo tanto solo se pudo analizar y comparar un número limitado de neuronas. En 10 neuronas que presentaron un patrón de disparo en ráfagas: seis (6) provenientes de rebanadas de animales $D4^{+/+}$, y cuatro (4) provenientes de rebanadas de animales $D4^{-/-}$, se encontraron diferencias significativas para el valor medio del tiempo de decaimiento (ms) de las espigas. El tiempo de decaimiento promedio en $D4^{-/-}$ fue casi 2 veces

menor que en D4^{+/+} (Student Test p<0.05). En los demás parámetros estudiados, no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla IV).

Tabla IV. Análisis de las propiedades generales de los potenciales de acción de de neuronas IB en rebanadas de CPF de ratones D4^{+/+} y D4^{-/-}

Parámetros de las neuronas IB	D4^{+/+}	D4^{-/-}
	(n=6)	(n=4)
Voltaje de membrana (mV)	-66.8 ± 0.7	-67.7 ± 1.7
Resistencia de membrana (mΩ)	150 ± 8.6	139.6 ± 10
Amplitud de los PA (mV)	116.2 ± 3.9	108.9 ± 8.8
Ancho de los PA (a 20pA del umbral) (ms)	2.9 ± 0.3	2.2 ± 0.1
Ancho de los PA (a la mitad de la amplitud.)(ms)	1.9 ± 0.2	1.7 ± 0.1
Umbral de los PA (mV)	-46.7 ± 1.7	-44.01 ± 2.3
Tiempo de subida 10-90% (ms)	0.4 ± 0.05	0.6 ± 0.04
Tiempo de decaimiento 90-10% (ms)	2.7 ± 0.3	1.5 ± 0.23*

*p<0.05 (Student t- Test).

En las neuronas con un patrón de disparo en ráfagas, luego de la primera espiga, es característica la presencia de una despolarización dependiente de calcio (DAP) seguida rápidamente por el disparo de otra espiga, en la mayoría de los casos de una amplitud menor a la primera (Yang et al., 1996). En todas las neuronas registradas se observó en forma muy clara la presencia de DAP y cualitativamente no se observaron diferencias entre las neuronas provenientes de los diferentes de ratones estudiados (D4^{+/+} y D4^{-/-}). Al igual que las neuronas RS e IM, en éstas neuronas, la relación corriente-voltaje fue lineal a potenciales entre -40 y -50 mV (Fig.1.6).

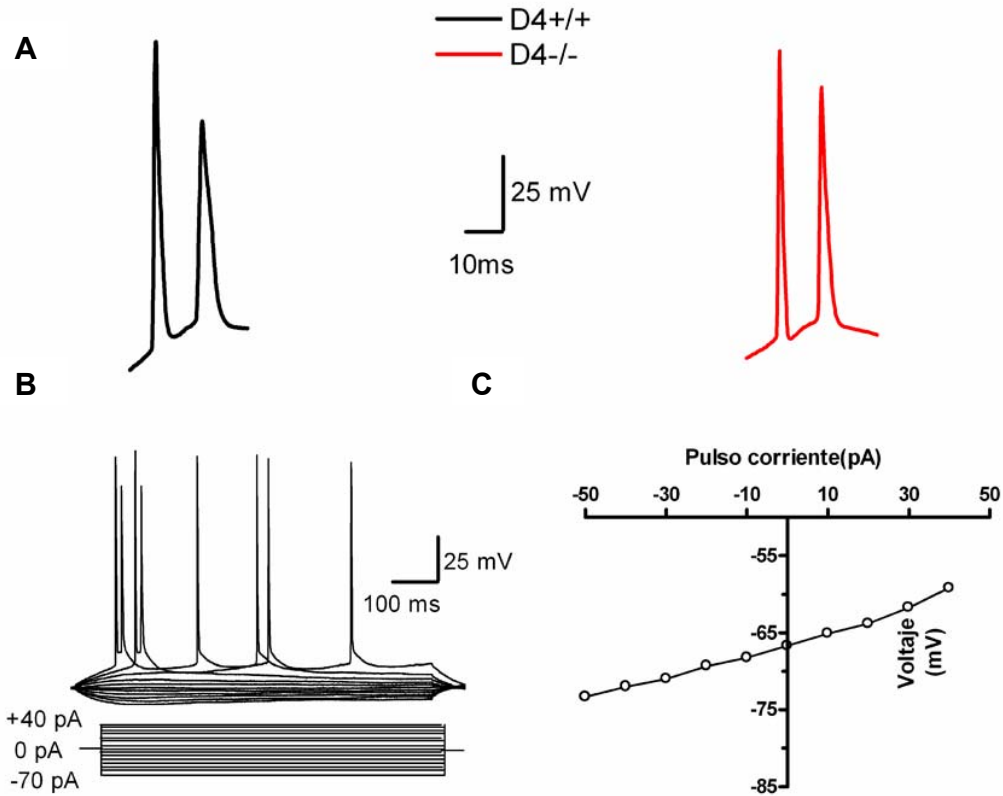


Figura 1.6: Características electrofisiológicas de las NPLV de disparo en ráfagas. A). Trazos representativos de potenciales de acción de neuronas IB provenientes de rebanadas de un ratón $D4^{+/+}$ (izquierda) y de un ratón $D4^{-/-}$ (derecha) B) Registro representativo en el modo fijación de corriente donde se observan los cambios del potencial de membrana de una neurona IB ($D4^{+/+}$) en respuesta a una serie de pulsos de corriente hiperpolarizante y despolarizante (protocolo: de -70pA a +40 pA con incrementos de a 10pA y una duración 800 ms).C) Relación voltaje-corriente (V-I) de respuestas evocadas en una neurona IB ($D4^{+/+}$) con un protocolo similar al descrito en la figura B.

Luego de la clasificación y el análisis realizado de acuerdo al patrón de disparo, se calculó la resistencia de membrana (R_m) y el potencial de membrana (V_m) promediando los valores de la mayoría de las neuronas registradas en este trabajo según fueran provenientes de animales $D4^{+/+}$ o de animales $D4^{-/-}$. En este cálculo no se tuvo en cuenta el tipo de patrón de disparo presentado. Los promedios calculados [V_m : $D4^{+/+} = -65.9 \pm 0.4$ mV ($n=60$); $D4^{-/-} = -64.8 \pm 0.5$ mV ($n=60$) y R_m : $D4^{+/+} = 122.0 \pm 5.9$ M Ω ($n=72$); $D4^{-/-} = 133.2 \pm 7.0$ M Ω ($n=73$)] no fueron estadísticamente diferentes entre sí.

Caracterización de las corrientes espontáneas en ratones $D4^{+/+}$ y ratones $D4^{-/-}$:

Análisis de corrientes post-sinápticas excitatorias

Para determinar si la ausencia del D4R modifica las señales pre-sinápticas que llegan a las NPLV, se estudiaron en detalle las corrientes post-sinápticas excitatorias espontáneas (EPSCs) en el ratón mutante nulo para el D4R y en el ratón salvaje. Utilizando la técnica de patch clamp en rebanadas de CPF en el modo fijación de voltaje y manteniendo a la célula en un voltaje de membrana cercano al potencial de reposo (-70 mV), se registraron 7 células de rebanadas provenientes de 4 ratones $D4^{-/-}$ y 7 células de rebanadas provenientes de 3 ratones $D4^{+/+}$. En todas las células se registraron corrientes entrantes espontáneas de amplitud variable con una cinética de activación rápida y un tiempo de decaimiento más lento, similares a las descritas por Wang y colaboradores (Wang and Zheng, 2001) para la misma región cortical (Fig.1.7). Las corrientes sinápticas fueron totalmente bloqueadas por CNQX, bloqueante específico de receptores glutamatergicos del tipo AMPA/Kainato y no por APV, o bicuculina, antagonista glutamatergico del tipo NMDA y antagonista $GABA_A$ respectivamente.

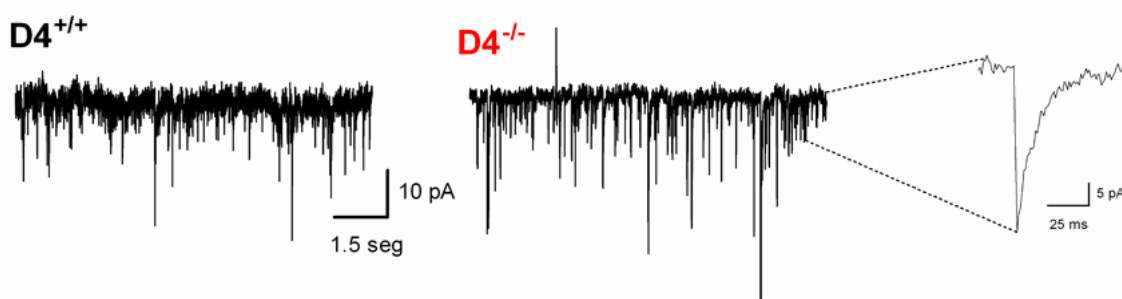


Figura 1.7: Corrientes post-sinápticas excitatorias espontáneas. Trazos representativos de EPSCs registrados manteniendo el potencial de membrana de la célula a -70mV en modo fijación de voltaje. Los registros provienen de rebanadas de un ratón $D4^{+/+}$ (izquierda) y de un ratón $D4^{-/-}$ (derecha). En el detalle, corriente ampliada que evidencia el tiempo rápido de activación y la cinética lenta de decaimiento característica de estas corrientes.

Frecuencia y amplitud

Tal como fue previamente reportado por Rubinstein y colaboradores (Rubinstein et al., 2001) se observó un aumento en la frecuencia y no en la amplitud de EPSCs en el ratón $D4^{-/-}$ respecto al ratón $D4^{+/+}$. En ambos casos, la distribución exponencial y el ajuste a una función exponencial simple que presentan los intervalos entre los distintos eventos espontáneos revela la ocurrencia aleatoria de los mismos (Fig.1.8a y b). En las células registradas provenientes del ratón $D4^{+/+}$, la frecuencia fluctuó entre 2.5 y 10.8 Hz con una media de 7.1 ± 1.0 Hz; mientras que en las células provenientes del ratón mutante, la frecuencia osciló entre 7.8 y 17.5 Hz, con una media significativamente mayor de 11.30 ± 1.2 Hz (t-Test $t=2.69$; $df=12$; $p=0.0196$) (Fig.1.8c). El análisis posterior reveló la presencia de un número significativamente mayor de corrientes sinápticas que presentaban "doble pico" en el ratón mutante (t-Test $t=2.71$; $df=12$; $p=0.0192$) (Fig.1.8d). Estas últimas no fueron consideradas en el análisis.

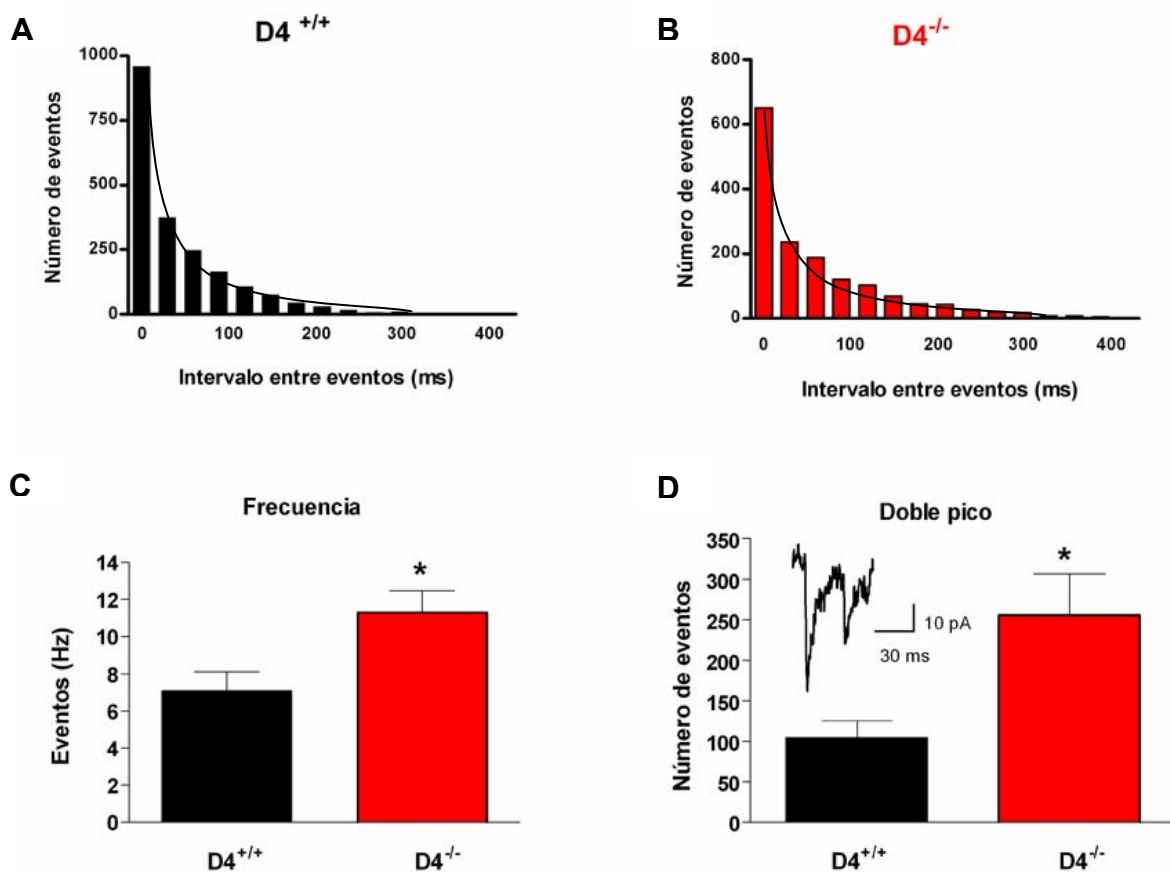


Figura 1.8: Análisis de frecuencia de EPSCs. Histogramas representativos de intervalos entre corrientes espontáneas, provenientes de registros continuos en modo fijación de voltaje de una célula de ratón $D4^{+/+}$ (A) y una de ratón $D4^{-/-}$ (B). Los intervalos (ms) entre los diferentes eventos espontáneos tienen una distribución exponencial y ajustan claramente a una función exponencial simple. C. El promedio del número de eventos espontáneos por minuto (frecuencia) es significativamente mayor en los ratones mutantes nulos para el D4R que en los ratones salvajes. D) La presencia de corrientes post-sinápticas excitatorias que poseen "doble pico" (detalle) es significativamente mayor en animales $D4^{-/-}$ que en $D4^{+/+}$.

Por otro lado, la amplitud promedio de los EPSCs no fue diferente (t- Test N.S) entre las neuronas provenientes de animales con distinto genotipo. Dentro de cada célula se encontró una gran variabilidad en las amplitudes de los eventos espontáneos. El rango de valores fue de 10.7 a 33.1 pA con una media de 16.6 ± 2.9 pA para las células del ratón salvaje; y 8.7 a 18.6 pA con una media de 13.0 ± 1.5 pA para las del ratón mutante (Fig.1.9a-c). El ruido, por otra parte, tuvo una distribución normal alrededor de 0, con un rango de desviación de entre 1.7 a 3.1 pA y una media de 2.3 ± 0.16 pA (calculado a partir de todos los registros en animales salvajes y mutantes, $n=14$, Fig.1.9 detalle en a).

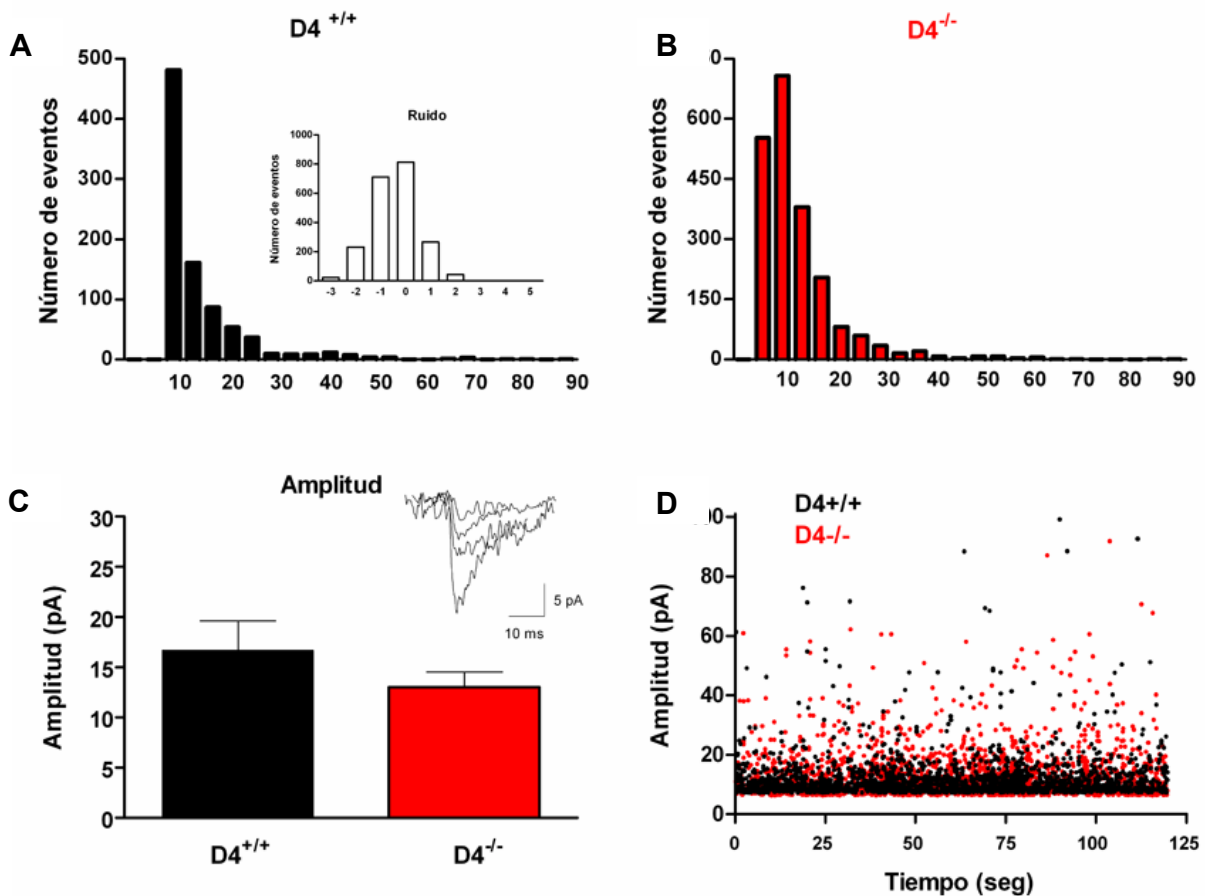


Figura 1.9: Análisis de amplitud de EPSCs. Histogramas representativos de amplitudes de las corrientes excitatorias espontáneas provenientes de registros continuos en modo fijación de voltaje de una célula piramidal (lámina V) de ratón D4^{+/+} (A) y una de ratón D4^{-/-} (B). En el detalle (A), histograma representativo de ruido graficado a partir de un registro continuo de una célula de ratón D4^{+/+}. C. La amplitud promedio de eventos espontáneos es igual en los ratones mutantes nulos para el D4R que en los ratones salvajes. En el detalle (C), superposición de 4 trazos representativos de EPSCs de diferente amplitud (D4^{-/-}) D) Gráfico representativo mostrando la amplitud de los eventos espontáneos en función del tiempo en una célula de D4^{+/+} y en una de D4^{-/-}. La distribución de las amplitudes a través del tiempo es similar en ambas células.

Efecto de dopamina en el control de la excitabilidad neuronal: participación del D4R.

Efecto de DA sobre el número de potenciales de acción evocados

Con el propósito de esclarecer el rol del D4R en la modulación dopaminérgica de las NPLV de la CPF de ratón, combinando técnicas electrofisiológicas y farmacológicas, se caracterizaron los efectos de la DA sobre la excitabilidad de éstas células realizando experimentos con la técnica de “patch clamp” en rebanadas de cerebro en el modo “célula entera” en neuronas provenientes de ratones salvajes y mutantes nulos para el D4R. Para ello, se cuantificó el número de potenciales de acción (NPA) evocados por estimulación eléctrica antes y después de la aplicación de DA (10 μ M) al baño de perfusión. Durante la perfusión de DA (20 minutos) se tomaron registros cada 2 minutos cuantificando, cada vez, el NPA y midiendo el potencial y la resistencia de membrana de la célula. Durante este análisis no se tuvo en cuenta el tipo de patrón de disparo de la neurona registrada.

Previo a estudiar el efecto de la perfusión con DA, se realizaron controles para corroborar la estabilidad de los registros. Para ello, se cuantificó a lo largo de al menos 40 minutos el NPA evocados por un pulso fijo de corriente supraumbral (100-200 pA) de 800 milisegundos de duración. En la mayoría de los casos estudiados, el NPA se mantuvo constante a lo largo de todo el experimento.

Utilizando una solución standard (BBS) de perfusión se realizaron una serie de experimentos en rebanadas de CPF de ratones D4^{+/+} (n=18). La aplicación de 10 μ M DA en el baño de perfusión incrementó la frecuencia de disparo de potenciales de acción en la mitad de las células registradas (porcentaje de aumento: 5min DA: $13.5 \pm 4.8\%$; t-Test: $t=$

2.8; $df= 7$; $p= 0.026$; 20min DA: $27.1 \pm 5.6\%$; t-Test: $t= 4.8$; $df= 8$; $p= 0.001$; $n= 9$. Fig.1.10 a) y mostró acciones opuestas, disminuyendo el NPA, en la otra mitad (porcentaje de disminución: 5min DA: $22.5 \pm 6.3\%$; t-Test: $t= 3.5$; $df= 8$ $p= 0.0081$; 20min DA: $34.6 \pm 8.8\%$ t-Test: $t= 3.9$; $df= 6$; $p= 0.0076$; $n= 9$. Fig.1.10 b). El efecto de DA no pudo ser lavado en ninguno de los experimentos luego de 20 minutos de perfusión con BBS standard.

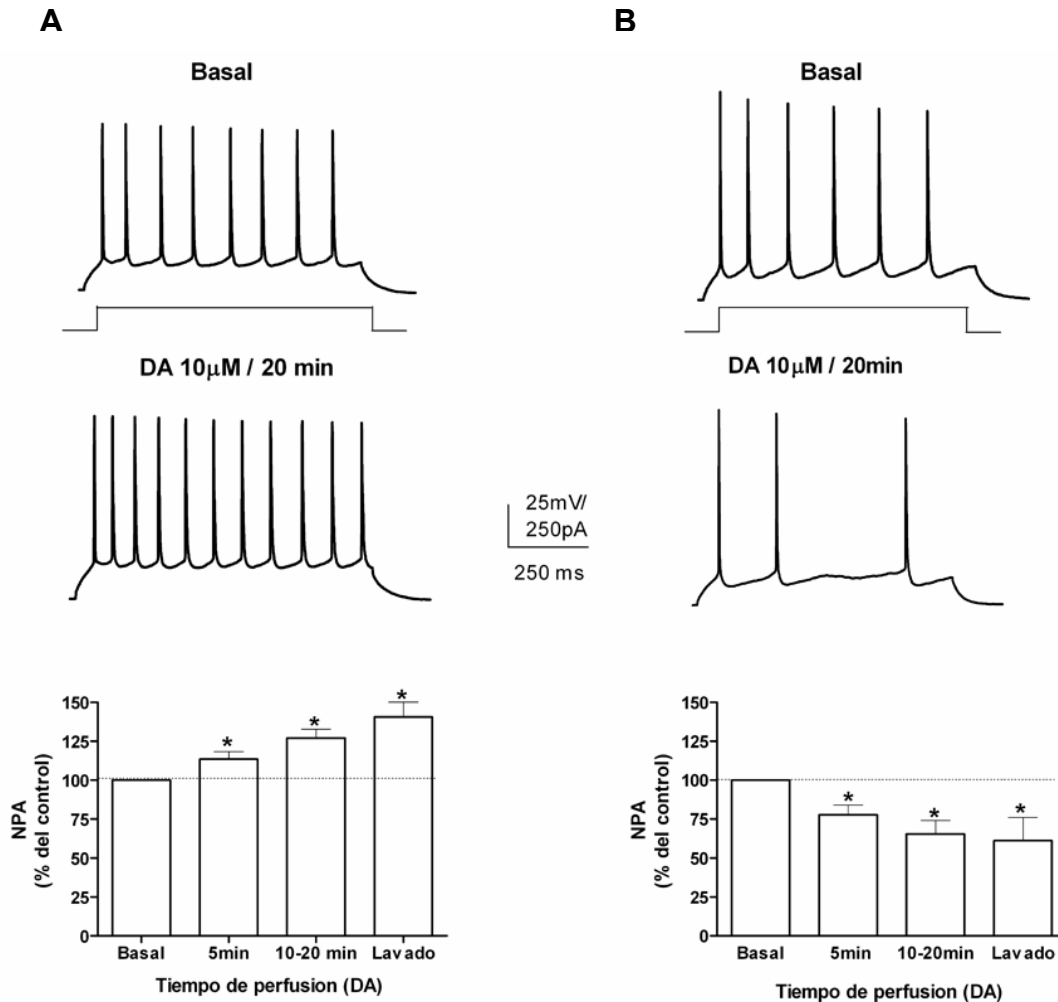


Figura 1.10: Efectos de la DA sobre la excitabilidad de las NPLV en ratones $D4^{+/+}$. DA $10\mu\text{M}$ produjo efectos excitatorios (A) e inhibitorios (B) sobre la excitabilidad de las NPLV de rebanadas provenientes de ratones $D4^{+/+}$. En la figura se ilustran trazos representativos mostrando el NPA evocados por un pulso de corriente antes (A y B arriba) y después (A y B medio) del agregado de DA $10\mu\text{M}$. Los gráficos de barras resumen cuantitativamente el incremento del NPA (A) y la disminución en el NPA (B) debida a la adición de DA al baño de perfusión (ANOVA, $*p<0.05$).

Al no utilizar bloqueantes de la actividad sináptica rápida, los resultados obtenidos en esta serie de experimentos corresponden posiblemente, a efectos directos e indirectos de la DA sobre las células registradas. Para evaluar directamente el efecto de la activación de los

DARs post-sinápticos sobre la neurona registrada, en una segunda serie de experimentos, decidimos aislar las neuronas de sus aferencias más importantes. Para ello, se utilizaron bloqueantes de los receptores glutamatérgicos, NMDA y AMPA (10 μ M APV y 10 μ M CNQX respectivamente) y de los receptores GABA_A (10 μ M bicuculina).

Bajo estas condiciones experimentales, en rebanadas de CPF de ratones D4^{+/+}, la aplicación de DA 10 μ M en el baño produjo una disminución en el NPA observado en el 64.7% de las células registradas (11 células de 17; porcentaje de inhibición: 5min DA: 32.7 \pm 8.8%, ANOVA p<0.01; 10min DA: 57.3 \pm 12.2%, p<0.001; Fig.1.11a y b). En el resto de las células, la acción de la DA se distribuyó de la siguiente manera: en el 6% (1 de 17 células) aumentó el NPA, y en el otro 29% (5 de 17 células), no tuvo efecto (datos no mostrados).

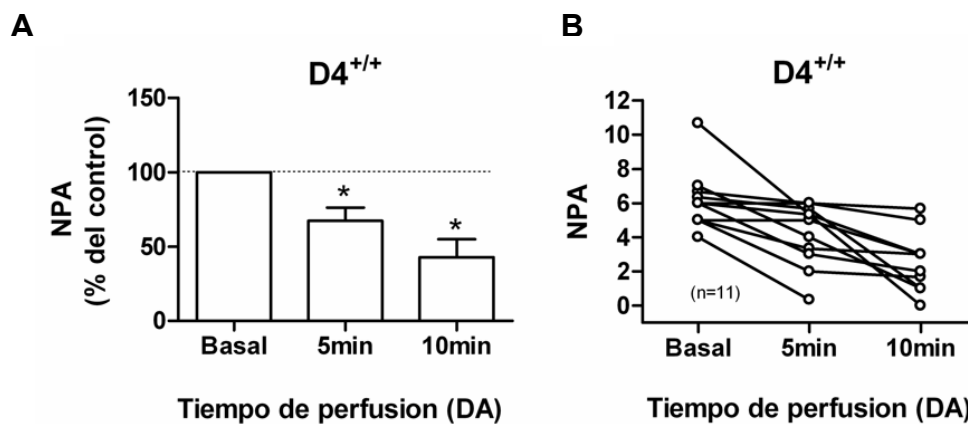


Figura 1.11: Efecto de DA sobre la excitabilidad de las NPLV en ratones D4^{+/+}. A) Efecto inhibitorio de DA 10 μ M sobre la excitabilidad de las neuronas piramidales de CPF provenientes de ratones D4^{+/+} (ANOVA, *p<0.05). B) Disminución en el NPA de cada célula durante el tiempo de perfusión con DA 10 μ M.

Por otro lado, en las neuronas piramidales de la CPF de ratones D4^{-/-} se observó una disminución similar en el NPA (porcentaje de inhibición: 5min DA: 38.1 \pm 13%, ANOVA p<0.05; 10min DA: 62.5 \pm 5.8%, p<0.001; Fig.1.12a y b). Sin embargo el porcentaje de células inhibidas por DA fue significativamente menor que en los animales salvajes y no superó al 39% del total de células registradas (7 de 18 células). Lo que fue notable, es que en el resto de las células, o sea en un 61% (11 de 18 células), la DA provocó aumentos en el NPA (porcentaje de aumento: 5min DA: 21.5 \pm 6.4%, ANOVA p<0.01; 10min DA: 27.5 \pm 4.5%, p<0.001; Fig.1.12c y d).

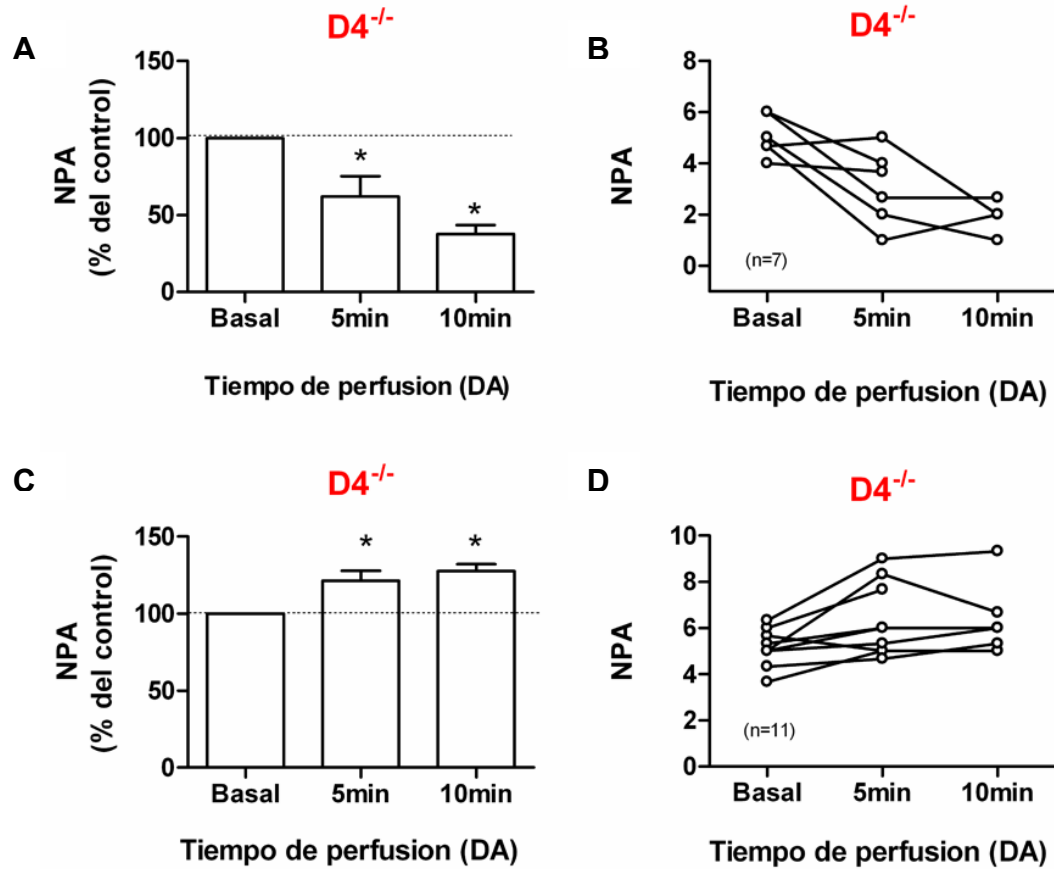


Figura 1.12: Efecto de DA sobre la excitabilidad de las NPLV en ratones D4^{-/-}. Efecto inhibitorio (A) y excitatorio (C) de DA 10 μ M sobre el NPA de las neuronas piramidales de CPF provenientes de animales D4^{-/-} (ANOVA, *p<0.05). B y D. Cambio en el NPA de cada célula durante el tiempo de perfusión con DA 10 μ M.

Tanto en animales D4^{+/+} como en D4^{-/-} se cuantificaron los valores de resistencia (R_m) y de voltaje de membrana (V_m) durante el tiempo que duró la aplicación de DA, discriminando de acuerdo al efecto producido por la misma sobre el NPA. No se observaron diferencias significativas en ninguno de los casos (Fig.1.13 y 1.14a y c). Por otro lado, se calcularon y compararon las medias para ambos parámetros antes de la perfusión con DA (basal). Los valores calculados, no fueron significativamente diferentes entre sí (D4^{+/+}: 147.9 \pm 18.6 M Ω y -66.9 \pm 0.6 mV, n=12; D4^{-/-}: 169.0 \pm 10.9 M Ω y -67.0 \pm 1.2 mV, n=18; Fig. 1.13 y 1.14d).

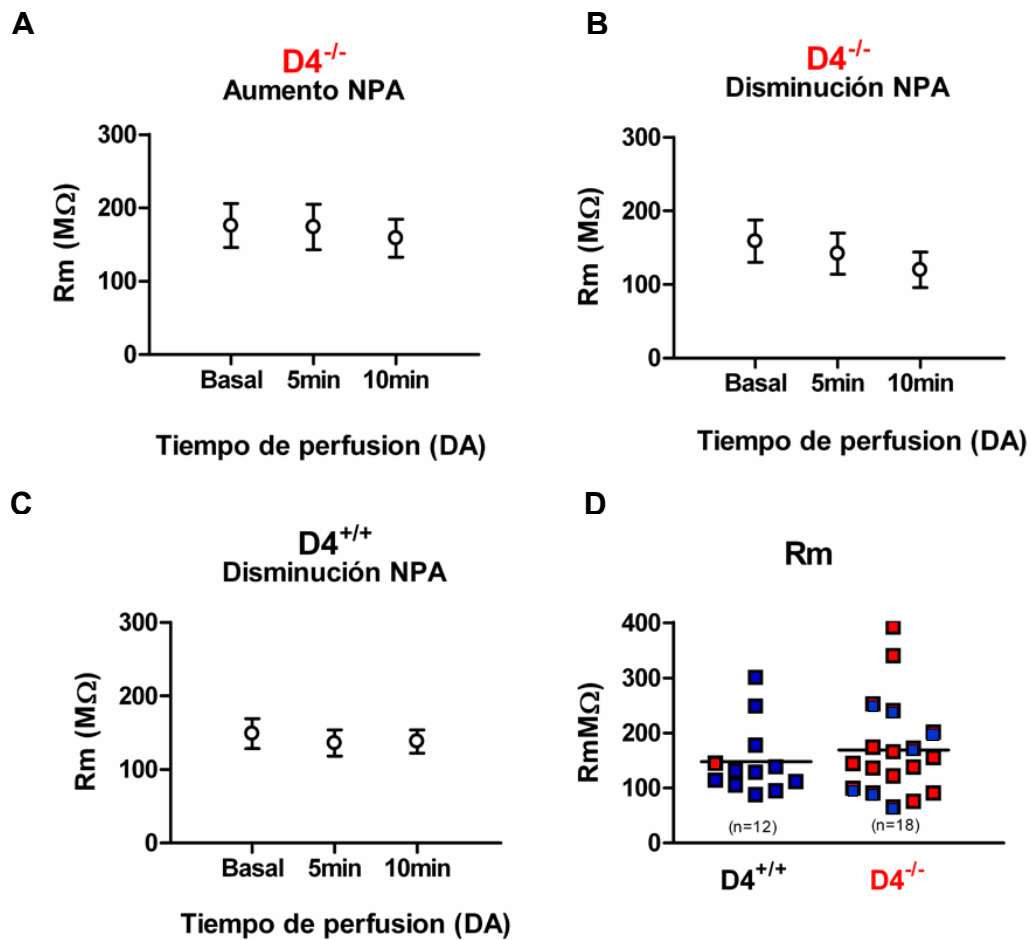


Figura 1.13: Efecto de DA sobre la resistencia de membrana. A-C. Cambio en la Rm durante el tiempo de perfusión con DA 10 μ M en ratones D4^{-/-} (A y B) y ratones D4^{+/+} (C). Las medias calculadas no fueron significativamente diferentes entre sí (ANOVA N.S, p>0.05) D) Valores de Rm para cada célula registrada proveniente de ratones D4^{+/+} ó D4^{-/-}. La línea horizontal representa la media poblacional. Los cuadros rojos, representan aquellas neuronas en donde DA produjo aumento en el NPA. Los cuadros azules, representan aquellas neuronas en donde DA produjo disminución en el NPA.

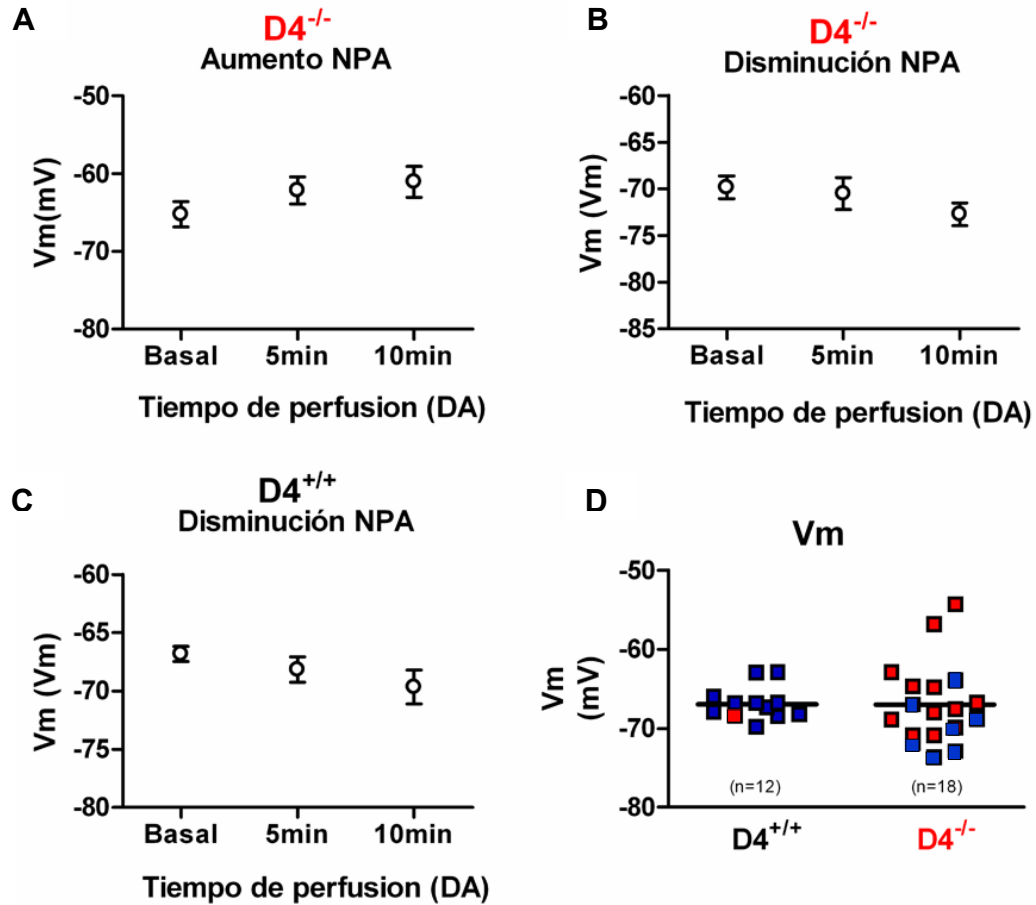


Figura 1.14: Efecto de DA sobre el voltaje de membrana. A-C. Cambio en el Vm durante el tiempo de perfusión con DA 10 μ M en ratones D4^{-/-} (A y B) y ratones D4^{+/+} (C). Las medias calculadas no fueron significativamente diferentes entre sí (ANOVA N.S, p>0.05).D) Valores de Vm para cada célula registrada proveniente de ratones D4^{+/+} ó D4^{-/-}. La línea horizontal representa la media poblacional. Los cuadros rojos, representan aquellas neuronas en donde DA produjo aumento en el NPA. Los cuadros azules, representan aquellas neuronas en donde DA produjo disminución en el NPA.

En las rebanadas de animales D4^{-/-}, siete (7) de dieciocho (18) células registradas, respondieron disminuyendo el NPA luego de la perfusión con DA. Para saber si la inhibición en el NPA observada se debía a la activación de los D2R, se realizaron experimentos similares a los anteriores, utilizando en lugar de DA, quinpirole, un agonista específico de receptores del “tipo D2”. Quinpirole 3 μ M produjo en forma consistente, una disminución significativa en el NPA tanto en neuronas provenientes de animales D4^{+/+} (porcentaje de inhibición: 5min DA: 26.8 \pm 8.0%, p<0.01, n=15) como de animales D4^{-/-} (porcentaje de inhibición: 5min DA: 20.8 \pm 8.9% p<0.05, n=11. Fig. 1.15a-d).

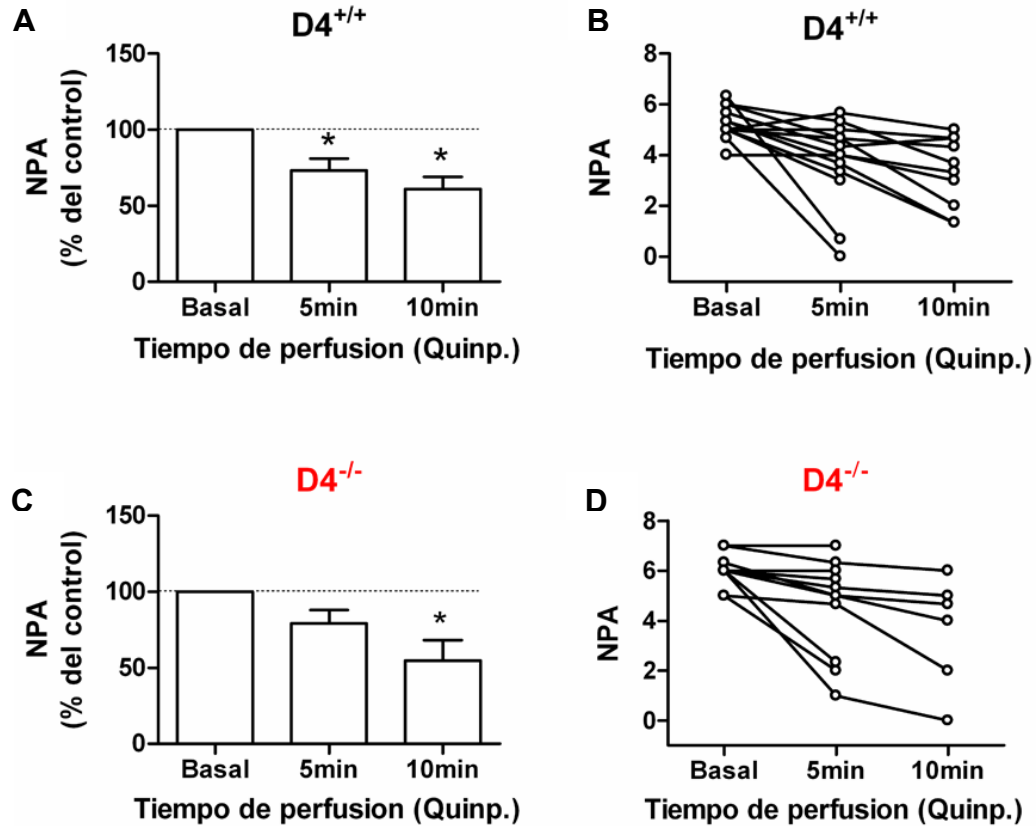


Figura 1.15: Efecto de Quinpirole sobre la excitabilidad de las NPLV. Efecto inhibitorio de Quinpirole 3 μ M sobre el NPA de las neuronas piramidales de CPF provenientes de animales D4^{+/+} (A) y D4^{-/-} (C) (ANOVA, *p<0.05). B y D. Cambio en el NPA de cada célula durante el tiempo de perfusión con Quinpirole 3 μ M.

Efecto de DA sobre las propiedades eléctricas de los potenciales de acción: análisis de espigas.

Después de estudiar el efecto de DA sobre el número de potenciales de acción evocados por un pulso fijo de corriente (sección anterior), algunas de las neuronas utilizadas en ese estudio fueron clasificadas según su patrón de disparo (D4^{+/+} n=6 y D4^{-/-} n=12). Posteriormente se realizó un análisis detallado de las propiedades de los potenciales de acción de cada subtipo celular, analizando la forma de la espiga y las propiedades eléctricas de la misma antes y después de agregar DA al baño de perfusión durante 10 minutos. Además del patrón de disparo, las neuronas fueron discriminadas según fueran procedentes de un ratón D4^{+/+} ó D4^{-/-}. Para la comparación estadística se usó el t-Test para muestras

apareadas. La utilización de este tipo de análisis estadístico permite contrastar los parámetros estudiados en cada espiga, antes y después del agregado de DA (Tabla V).

Tabla V. Efecto de DA sobre las propiedades de los potenciales de acción. Parámetros de los potenciales de acción de las NPLV provenientes de animales D4^{+/+} y D4^{-/-}, antes y después de 10 minutos de perfusión con DA 10 μ M.

	D4^{+/+}		D4^{-/-}			
	Disminución NPA (n=6)		Aumento NPA (n=6)		Disminución NPA (n=6)	
	Control	DA	Control	DA	Control	DA
Vm (mV)	-66.8 \pm 0.6	-69.6 \pm 1.4	-65 \pm 1.6	-61 \pm 2.0	-69.8 \pm 1.2	-72.7 \pm 1.2
Rm (mΩ)	148.8 \pm 20.4	138.0 \pm 16	175.7 \pm 29	154.4 \pm 25	158.6 \pm 28	120 \pm 24
Amplitud (mV)	112.3 \pm 2.5	109.3 \pm 3.8	101.2 \pm 4.0	100.4 \pm 5.0	112.8 \pm 2.7	111.6 \pm 4.7
Ancho (ms)	2.4 \pm 0.1	2.5 \pm 0.1	3.4 \pm 0.3	3.4 \pm 0.3	2.8 \pm 0.2	3.0 \pm 0.3
Ancho (a la mitad de la ampl.) (ms)	1.6 \pm 0.1	1.6 \pm 0.1	2.2 \pm 0.2	2.2 \pm 0.2	1.7 \pm 0.1	1.9 \pm 0.1
Umbral (mV)	-45.7 \pm 1.7	-44.5 \pm 2.2	-43.3 \pm 2.7	-40.9 \pm 3.3	-42.8 \pm 1.7	-44.6 \pm 3.1
T. de subida 10-90% (ms)	0.5 \pm 0.4	0.6 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1	0.8 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1
T. de decaim. 90-10% (ms)	2.3 \pm 0.2	2.1 \pm 0.2	3.2 \pm 0.3	3.2 \pm 0.4	2.5 \pm 0.2	2.5 \pm 0.3

La comparación de los parámetros no reveló diferencias significativas en las propiedades de las espigas debidas al efecto de DA 10 μ M.

I.3 DISCUSIÓN

Como fue mencionado en la introducción, si bien existen numerosos trabajos que intentan explicar el papel de la dopamina en el control de la excitabilidad cortical, la función particular de cada subtipo de receptor dopaminérgico aun no ha sido del todo aclarada. Las evidencias electrofisiológicas de la participación del D4R en este aspecto han sido muy poco estudiadas. En particular, Rubinstein y colaboradores (Rubinstein et al., 2001) demostraron hiperexcitabilidad cortical producto de la ausencia del D4R. Mientras que otros dos trabajos (Wang et al., 2002; Wang et al., 2003) revelan un rol post-sináptico del receptor en la modulación de las corrientes gabaérgicas y glutamatérgicas del tipo NMDA. Sin embargo, el papel funcional del D4R en la generación de potenciales de acción y su influencia en las propiedades intrínsecas de las NPLV de la CPF de ratón aún no han sido descriptas.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en esta primera parte del trabajo de tesis nos propusimos estudiar el rol del D4R en el control de la excitabilidad de las neuronas piramidales de la CPF utilizando un modelo de ratón mutante nulo para ese receptor.

La comparación de algunos parámetros pasivos y activos de las neuronas provenientes del D4^{-/-} con las neuronas provenientes de ratones D4^{+/+}, nos permitió centrar nuestra atención en el estudio de la función del D4R y su papel activo en algunos aspectos del control de la excitabilidad en la CPF de ratones. Los puntos más relevantes derivados de los resultados obtenidos en este capítulo, serán discutidos a continuación.

Patrón de disparo de potenciales de acción y análisis de espigas: Contribución del D4R en el modelado de conexiones sinápticas y la formación de circuitos neuronales durante el desarrollo.

Existe consenso en la bibliografía acerca de que las neuronas corticales presentan diferentes patrones de disparo claramente identificables entre sí (Connors and Gutnick, 1990; Yang et al., 1996; Degenetais et al., 2002). En este trabajo se agruparon las neuronas piramidales de acuerdo al criterio utilizado por Yang y colaboradores en experimentos

realizados en rodajas de CPF de rata utilizando microelectrodos (Yang et al., 1996). Tanto en las neuronas provenientes de animales $D4^{+/+}$ como en las provenientes de ratones $D4^{-/-}$, fueron detectados tres de los cuatro patrones de disparo reportados anteriormente para las NPLV. Sólo el patrón de disparo perteneciente a las neuronas "ROB" (del inglés, "Repetitive Oscillatory Bursting") no fue detectado en las condiciones de nuestros experimentos. A su vez, la proporción de patrones de disparo encontrados difiere de lo reportado por Yang y colaboradores (Yang et al., 1996). En nuestro trabajo, el número de neuronas con disparo en ráfaga (IB) fue casi siete veces menor al reportado por Yang y col. mientras que, por el contrario, el patrón encontrado con una mayor frecuencia fue el de las neuronas intermedias (IM) cuya proporción supera, en casi 10 veces, a la encontrada en el trabajo citado. Por lo tanto, en las condiciones de nuestros experimentos, hay un aumento considerable en la proporción de neuronas intermedias (IM) y una disminución significativa en el número de neuronas del tipo IB. Las neuronas IB son fáciles de identificar por la presencia de una despolarización post- potencial de acción (DAP) que favorece el disparo consecutivo de otro potencial de acción de menor o igual amplitud al primero cuando la neurona es estimulada con un pulso de corriente rectangular. Sin embargo, cuando la corriente depolarizante suministrada es pequeña, estas neuronas responden evocando un solo potencial de acción, que por las características mencionadas, no difiere en absoluto de los potenciales evocados por las neuronas del tipo IM. Para la clasificación de los subtipos celulares en este trabajo, no se tuvo en cuenta, en la mayoría de los casos, la utilización de una familia de pulsos de corriente que permitiera discriminar de una mejor manera el patrón de disparo. Debido a ello, no podemos descartar que una gran parte de las neuronas clasificadas como IM, corresponda en realidad al subtipo IB, lo que explicaría en gran parte la discrepancia encontrada entre nuestros resultados y los de Yang y col.

Otro punto que difiere con lo publicado es la ausencia de neuronas con patrón de disparo del tipo ROB. Este subtipo neuronal se caracteriza principalmente por el disparo espontáneo de potenciales de acción. Más aún, cuando estas neuronas son estimuladas con un pulso de corriente depolarizante, disparan repetitivamente en ráfagas durante el tiempo que dura el pulso (Silva et al., 1991). La propiedad de disparo espontáneo de algunos subtipos de neuronas corticales depende del tipo de conexiones intercelulares y sobre todo, de la integridad de dichas conexiones (Silva et al., 1991). La ausencia de este patrón en las

condiciones de nuestros experimentos se puede explicar por la falta de conexiones intercelulares y la pérdida de numerosas porciones de las dendritas apicales y basales debidas al corte de las rebanadas. A diferencia de las rebanadas utilizadas en este trabajo (300 μm), Yang y col. utilizan rebanadas de mayor espesor (450 μm) que conservan, además, una gran parte de los axones que desde las NPLV proyectan al núcleo Accumbens.

Tanto en células provenientes de animales $D4^{+/+}$ como en aquellas provenientes de animales $D4^{-/-}$ la frecuencia de neuronas del tipo RS encontrada fue mayor que la reportada por Yang y colaboradores. Existen evidencias acerca de que, frente a diferentes condiciones fisiológicas, una misma neurona podría intercambiar entre diferentes patrones de disparo (Steriade, 2004). Si bien no está comprobado que la técnica utilizada para realizar los registros modifique de alguna manera el patrón de disparo de la célula registrada y condicione los resultados obtenidos, es curioso que, utilizando la misma técnica que la usada en este trabajo ("patch clamp"), Williams y colaboradores (Williams and Stuart, 1999) reportaron en la corteza somatosensorial, la misma proporción de neuronas del tipo RS que la encontrada en nuestros experimentos.

Cada uno de los diferentes patrones de disparo presentes en las neuronas del sistema nervioso central se corresponde con funciones específicas dentro del cerebro (Zhou and Hablitz, 1996) involucrando conexiones particulares que contribuyen de una forma determinada al circuito eléctrico que funciona en la corteza cerebral. El refinamiento de las conexiones sinápticas que van a formar parte del circuito eléctrico se produce durante el proceso de maduración del sistema nervioso central y depende de la actividad eléctrica de las células (Spitzer, 1991; Ebstein et al., 1996) y, entre otras cosas, de la normal expresión y maduración de los receptores dopaminérgicos en las distintas regiones del cerebro (Tarazi et al., 1998). El desarrollo patológico de los DARs ha sido asociado en numerosas oportunidades a la aparición de trastornos psicóticos que se evidencian en el cerebro adulto (Weinberger, 1987; Benes, 1995). Por otro lado, existen evidencias que han demostrado hiperactividad cortical en animales mutantes nulos para el D4R (Rubinstein et al., 2001) indicando que, al menos la corteza prefrontal de estos animales es diferente a la de los ratones salvajes. Si la influencia del D4R sobre el modelado de las conexiones sinápticas que se forman durante el desarrollo es significativa, y la hiperactividad encontrada en el cerebro adulto de los animales mutantes nulos para ese receptor es el resultado de la ausencia del

D4R durante las etapas de desarrollo del cerebro, sería factible encontrar diferencias en la proporción de los diferentes subtipos celulares, y /o en las propiedades intrínsecas de los potenciales de acción de las neuronas de la corteza de estos animales. En nuestro trabajo solo evidenciamos diferencias entre los animales de distinto genotipo en solo dos casos (ver Tabla III y IV). Tales diferencias no parecen tener correlación con la falta del D4R sino más bien, parecen ser debidas al número reducido de los casos estudiados. En todos los demás casos, el análisis cualitativo y cuantitativo de los parámetros intrínsecos de las espigas, así como también la proporción de los diferentes subtipos celulares encontrados, no mostraron diferencias significativas en el ratón $D4^{-/-}$ con respecto al ratón $D4^{+/+}$. Estos resultados sugieren que el D4R no parece ser fundamental en el modelado de los circuitos neuronales que se forman durante el desarrollo y que gobiernan el funcionamiento de la corteza en el cerebro adulto. Sin embargo, no podemos descartar la aparición de fenómenos compensatorios que subsanen la falta del D4R y contribuyan al desarrollo normal del cerebro (Gan et al., 2004), así como tampoco la existencia de alteraciones a nivel de las conductancias iónicas que subyacen a los distintos subtipos celulares y que no necesariamente modifican los patrones de disparo de una manera evidenciable.

Corrientes excitatorias espontáneas: Rol presináptico del D4R

El estudio de la actividad sináptica espontánea permite entender mas en detalle la naturaleza de las señales que llegan a las en las NPLV de la CPF desde las terminales presinápticas, como por ejemplo desde las neuronas dopaminérgicas que proyectan sus axones desde el área tegmental ventral (VTA). Para determinar si la ausencia del D4R modifica éstas señales, se estudiaron en detalle las corrientes post-sinápticas excitatorias espontáneas (EPSCs) mediadas por los receptores AMPA, en el ratón mutante nulo para el D4R y en el ratón salvaje. Un estudio similar en el ratón $D4^{-/-}$, fue realizado por Rubinstein y colaboradores (Rubinstein et al., 2001) en donde se reportó, por primera vez, un rol presináptico del D4R en la modulación de estas corrientes. El objetivo principal de nuestros experimentos fue profundizar aún mas en el estudio de las corrientes post-sinápticas excitatorias considerando algunos puntos que no se tuvieron en cuenta en el trabajo anteriormente citado.

La caracterización de las corrientes excitatorias post-sinápticas realizadas en nuestro trabajo en la CPF del ratón $D4^{+/+}$, coinciden ampliamente con el estudio realizado por Wang y colaboradores (Wang and Zheng, 2001) en la misma región del cerebro. El rango de frecuencias y de amplitudes encontrados fue muy similar al reportado. La única discrepancia encontrada tiene relación con el valor promedio calculado para el ruido. En nuestros experimentos, el ruido promedio es 2.7 veces más grande que el calculado por Wang y col. Este hecho sin embargo, no altera la distribución de amplitudes ya que los eventos más pequeños reportados en el trabajo citado tienen una amplitud similar a los encontrados en este estudio y son 4 veces más grandes que el ruido máximo detectado en nuestro sistema de registro.

El análisis de la distribución de los intervalos existentes entre los eventos espontáneos, permite estudiar si la ocurrencia de los eventos es aleatoria o depende de algún factor que condiciona la liberación de neurotransmisor (Borst et al., 1994). Tal como fue anteriormente reportado (Wang and Zheng, 2001) en los ratones $D4^{+/+}$, la distribución de los intervalos entre los eventos que llegan a las NPLV, se ajustó a una función exponencial simple. El mismo resultado se obtuvo para los ratones $D4^{-/-}$ demostrando que la ocurrencia de los eventos espontáneos se produce al azar en estas neuronas. Para los ratones mutantes nulos, este análisis no había sido realizado con anterioridad a este trabajo.

Por otro lado, la cuantificación de corrientes de “doble pico” también fue realizada por primera vez en este trabajo. En ausencia del D4R, la proporción de corrientes de doble pico encontrada fue significativamente mayor que en los ratones $D4^{+/+}$. Las corrientes de doble pico son originadas en la mayoría de los casos, por la liberación exacerbada de neurotransmisor (Wang and Zheng, 2001) y es una evidencia mas a favor del aumento en la excitabilidad de la corteza del ratón $D4^{-/-}$.

Cuando se comparó la frecuencia y amplitud de eventos entre los ratones de diferente genotipo, los resultados coincidieron en su totalidad con los reportados por Rubinstein y colaboradores (Rubinstein et al., 2001). Un aumento en la frecuencia sin cambios significativos en la amplitud promedio de EPSCs en las células provenientes de ratones $D4^{-/-}$, claramente implica un fenómeno de modulación presináptica (Dudel and Kuffler, 1961; Takahashi et al., 1996).

Un aumento en la frecuencia de eventos post-sinápticos espontáneos se explica por un aumento en la liberación de glutamato desde la presinápsis. Aunque no se trate del mismo receptor, existen numerosas evidencias de que la activación presináptica del D2R en el cuerpo estriado, reduce la liberación de glutamato por múltiples mecanismos (Wilke et al., 1998; Rubinstein et al., 2001) entre ellos, la reducción de las corrientes de Ca^{+} involucradas en la liberación de este neurotransmisor (Partridge et al., ; Bargas et al., 1998). Si bien aún no ha sido estudiado el mecanismo de acción en los D4R, los resultados observados en el ratón $D4^{-/-}$ son consistentes con un rol inhibitorio del receptor sobre las NPLV. En concordancia con los resultados anteriormente expuestos relativos a la proporción de patrones de disparo encontrados y al estudio de los parámetros intrínsecos de las espigas (ver sección anterior), es poco probable que el aumento observado en la frecuencia de EPSCs en el animal $D4^{-/-}$, sea ocasionado por la ausencia del D4R durante las etapas de modelado de los circuitos neuronales durante el desarrollo. Una evidencia experimental a favor de esta hipótesis, proviene de experimentos farmacológicos realizados en ratones salvajes, en donde la aplicación aguda del agonista específico para el D4R, PNU-101387G, incrementa la frecuencia de corrientes excitatorias espontáneas asemejando el efecto de la mutación nula para el D4R (Rubinstein et al., 2001).

Es probable que la acción efectiva sobre la actividad espontánea de la corteza en el ratón salvaje, sea la resultante de una acción inhibitoria conjunta de los D4R pre y post-sinápticos. En efecto, la activación de los D4R post-sinápticos, produce cambios en los receptores glutamatérgicos del tipo NMDA disminuyendo la corrientes post-sinápticas mediadas por esos receptores en la CPF (Wang et al., 2003).

Participación del D4R en el control de la excitabilidad cortical en las NPLV

El entendimiento de cómo DA participa en el control de la excitabilidad general de la CPF a través de la modulación de las propiedades electrofisiológicas básicas de las neuronas piramidales, es un tema muy complejo y difícil de abordar experimentalmente.

En las últimas décadas numerosos laboratorios han afrontado este tema desde diferentes puntos de vista, y aún así, es muy difícil conciliar los resultados y obtener un panorama acabado de los mecanismos a través de los cuales DA ejerce su acción.

Con el uso de un ratón mutante nulo para el D4R, el objetivo principal de esta parte de la tesis fue tratar de entender más profundamente la participación del D4R en el control de la excitabilidad de las neuronas principales que integran la CPF. Sin indagar en profundidad sobre los mecanismos particulares del receptor en estudio, el abordaje desde distintos puntos de vista nos permitió arribar a algunas conclusiones que merecen ser discutidas.

Efectos del D4R independientes de la transmisión sináptica (rápida)

Tal como se resume la Fig.1.16, los efectos de DA sobre las neuronas provenientes de animales $D4^{+/+}$ fueron diferentes a los efectos de DA observados sobre las células de animales $D4^{-/-}$. En ratones $D4^{+/+}$, DA $10\mu\text{M}$ tuvo un efecto inhibitorio sobre la generación de potenciales de acción en la mayoría de las neuronas registradas. Por el contrario, en ratones $D4R^{-/-}$ se evidenciaron claramente dos grupos diferentes de neuronas: uno mayoritario que respondió incrementando el NPA y otro menos frecuente, que respondió en forma opuesta, disminuyendo el NPA luego de la aplicación de DA. El hecho de que estos efectos de aumento o disminución del NPA ocurrieran en presencia de bloqueantes de las aferencias sinápticas más importantes de las células piramidales, sugiere que el efecto de la DA es independiente de la transmisión glutamatérgica y de la GABAérgica. Sin embargo, no se puede descartar un efecto indirecto de la DA a través de otras aferencias (por ejemplo colinérgicas o serotoninérgicas) que llegan a la misma región de la CPF y para las cuales no se utilizaron bloqueantes durante los experimentos realizados.

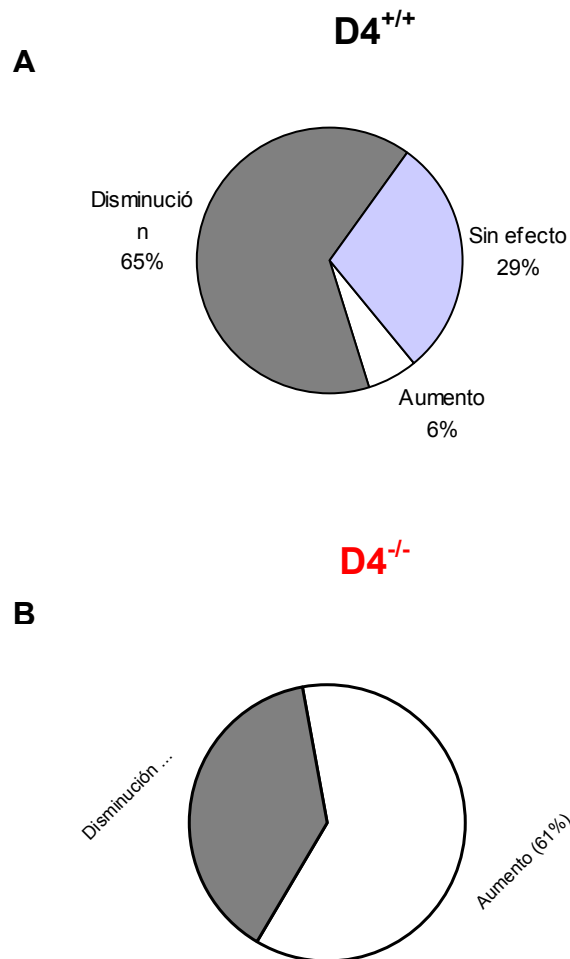


Figura 1.16: Efecto de DA en la excitabilidad de las NPLV. Los gráficos resumen el efecto de DA 10µM en la excitabilidad de las neuronas piramidales de CPF provenientes de animales D4^{+/+} y D4^{-/-}. Los valores se expresan como porcentaje del total de células registradas.

En la CPF de monos y roedores, se ha reportado la presencia de receptores del tipo D1 y D2 en células piramidales glutamatérgicas y no piramidales gabaérgicas (Goldman-Rakic et al., 1989; Sesack et al., 1995). Sin embargo, hasta el momento, existe controversia si estos receptores se expresan conjuntamente en la misma célula o en poblaciones celulares distintas.

Nuestra hipótesis es que, en algunas células piramidales de la CPF de los roedores, se expresan conjuntamente ambos tipos de receptores. Por lo tanto, los efectos de la DA observados serían el resultado de la interacción de ambos tipos de receptores en la misma

célula. En los animales $D4^{+/+}$, la presencia del D4R (y el D2R) conjuntamente con el D1R/D5R resulta en una disminución en la excitabilidad ocurrida en la mayoría de estas neuronas cuando la DA es adicionada al baño de perfusión. Por el contrario, la ausencia total del D4R en los animales con una mutación nula para este gen, aumenta el porcentaje de neuronas que responden incrementando su excitabilidad. Solo en aquellas células en donde el D2R esta presente, el efecto de DA produce disminución en el NPA. Efectivamente, el efecto inhibitorio de quinpirole en ausencia del D4R (ratón mutante) confirma la participación del D2R en la modulación del disparo de potenciales de acción.

En resumen, nuestros resultados sostienen la idea de un rol inhibitorio del D4R (al igual que el D2R) en las NPLV de la CPF. Estas evidencias concuerdan además con reportes previos que describen hiperexcitabilidad cortical en ratones $D4R^{-/-}$ (Rubinstein et al., 2001; Falzone et al., 2002) y sugieren que los D4R contribuirían al control del disparo de los potenciales de acción en estas neuronas.

CAPÍTULO II

Propiedades farmacológicas y funcionales de las variantes polimórficas del receptor dopaminérgico D4 humano

II.1. INTRODUCCIÓN

Con el objeto de profundizar en la caracterización de las propiedades farmacológicas y fisiológicas de los subtipos más frecuentes del receptor dopaminérgico D4 humano (hD4R), en esta segunda parte del trabajo se realizaron estudios funcionales mediante la co-expresión, en ovocitos de *Xenopus laevis*, de las variantes D4.2, D4.4 y D4.7 del hD4R junto a canales de potasio regulados por proteína G, del tipo GIRK1.

II.2. RESULTADOS

La estimulación del hD4R por dopamina, noradrenalina y serotonina, modula las corrientes de K⁺ mediadas por GIRK1.

En una solución de baja concentración de K⁺ (2 mM), y manteniendo el potencial de membrana a -100 mV, los ovocitos inyectados únicamente con ARNm de GIRK1 no desarrollaron una corriente iónica significativa. Sin embargo, cuando los mismos ovocitos fueron expuestos a una solución de alta concentración de K⁺ (96mM), tal como ha sido previamente descrito en la sección de Materiales y Métodos, se desarrolló una corriente similar a la mediada por canales de GIRK, de cinética rápida, sensible a Ba²⁺, que mostró una fuerte dependencia al voltaje (Fig.2.1).

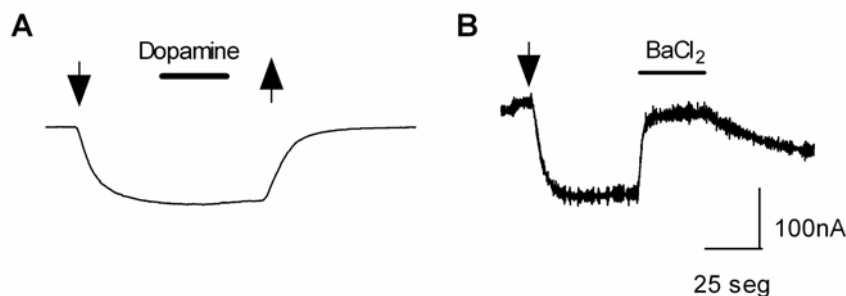


Figura 2.1: Bloqueo por Ba²⁺ de la corriente GIRK. A) Trazo representativo de una corriente registrada en ovocito inyectado solamente con mRNA que codifica para GIRK1: a -100 mV y en presencia de 96mM de K⁺, se desarrolló una corriente entrante rápida y reversible. La aplicación de 100nM DA sobre el plateau de esta corriente no produjo incremento en la amplitud de la misma. B) 1 mM de BaCl₂ bloqueó de manera reversible

el 100 % de la corriente mediada por canales GIRK1. Las flechas indican el comienzo (↓) y el final (↑) de la perfusión con solución de alto K⁺.

La aplicación de DA, NA o 5HT sobre estos ovocitos no indujo efectos modulatorios sobre esta corriente. Una vez evocada, la corriente GIRK se mantuvo estable mientras duró la perfusión con la solución de alto K⁺, sin embargo, en aquellos ovocitos en los cuales la amplitud de la corriente era muy grande, luego de llegar a un pico de amplitud máxima, la corriente disminuyó rápidamente hasta estabilizarse en una amplitud menor (Fig.2.2). Para reducir la variabilidad, estos ovocitos fueron descartados y solo se utilizaron aquellos que evidenciaron corrientes de amplitud estable de aproximadamente 108.3 ± 10.7 nA (n=15).

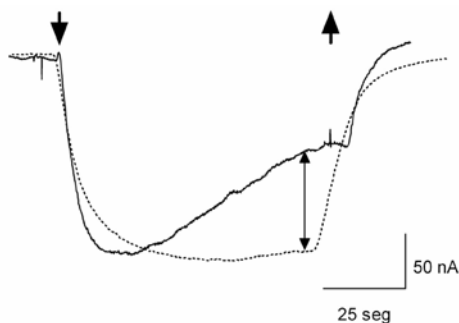


Figura 2.2: Desensibilización de corrientes GIRK. Trazo representativo que muestra la desensibilización de la corriente GIRK registrada en un ovocito inyectado solamente con mRNA de GIRK1. En el ejemplo (trazo lleno) se observa que en presencia de 96mM de K⁺ y a -100 mV se desarrolló una corriente entrante rápida que luego de llegar a un pico disminuyó para estabilizarse a valores de menor amplitud. El trazo punteado ilustra la respuesta esperable para una corriente GIRK que no desensibiliza. Las flechas indican el comienzo (↓) y el final (↑) de la perfusión con solución de alto K⁺. La flecha con dos puntas (↕) indica la diferencia en la amplitud de la corriente causada por la desensibilización.

Aquellos ovocitos inyectados solamente con ARNm de alguna de las variantes del hD4R (en ausencia de GIRK1) no fueron capaces de evocar corriente en la solución de alto K⁺ y no mostraron ninguna señal detectable con la adición de DA, NA o 5HT al baño de perfusión. Contrariamente, cuando los ovocitos fueron inyectados con ARNm de GIRK1 junto al ARNm de alguna de las variantes polimórficas D4.2, D4.4 o D4.7, la aplicación de DA, NA y 5HT sobre el plateau de la corriente iónica mediada por GIRK1, fue capaz de modular positivamente esta corriente, debido al acoplamiento funcional entre hD4R y GIRK1 en la membrana del ovocito.

Los efectos de 100 nM DA, 10 μ M NA y 100 μ M 5HT sobre la corriente GIRK, se muestran en la Fig.2.3a. Las tres monoaminas testeadas produjeron un incremento rápido y reversible en la amplitud de la corriente, el cual persistió durante el tiempo de aplicación del agonista (~30 seg).

El efecto máximo sobre la amplitud de la corriente GIRK fue observado a concentraciones de DA cercanas a 100 nM. Por otro lado, NA y 5HT tuvieron su efecto máximo a concentraciones más altas (10 y 100 μ M respectivamente). Los valores de corriente máxima evocada por 100 nM DA fueron: 292.6 ± 27.3 nA (n=12) para D4.2; 253.0 ± 22.4 nA (n=18) para D4.4 y, 295.1 ± 33.5 nA (n=14) para D4.7. Para 10 μ M NA fueron: 250.8 ± 24.7 nA (n=10) para D4.2; 260.8 ± 48.5 nA (n=10) para D4.4 y, 271.4 ± 21.0 nA (n=9) para D4.7. Mientras que, las corrientes máximas evocadas por 100 μ M 5HT fueron: 203.3 ± 27.3 nA (n=9) para D4.2; 161.0 ± 21.1 nA (n=8) para D4.4 y, 218.2 ± 25.5 nA (n=14) para D4.7 (Fig.2.3b). Cuando se comparó entre las distintas variantes polimórficas, no se encontraron diferencias significativas en la amplitud máxima evocada por cada una de las monoaminas utilizadas (N.S., *two-way* ANOVA test, $p > 0.05$).

Los efectos de DA, NA y 5HT sobre las variantes del hD4R fueron específicos ya que precursores de DA y 5HT, como L-DOPA o L-triptofano y neurotransmisores no monoaminérgicos, como L-glutamato, GABA o acetilcolina, no modularon las corrientes de GIRK cuando fueron agregados al baño de perfusión. Por otro lado, la adición de altas concentraciones de DA, NA o 5HT no produjo cambios en las propiedades eléctricas tales como potencial, resistencia, o corriente basal de la membrana de ovocitos utilizados como controles inyectados solamente con agua.

En esta etapa, se estudió también la relación corriente-voltaje (I-V) de la corriente iónica inducida por alto K^+ , en presencia o ausencia de DA (100 nM). La Fig.2.4c ilustra un experimento representativo en donde la amplitud de la corriente fue medida en un rango de voltajes desde -120 hasta +40 mV, en un ovocito co-inyectado con mRNA de D4.4 y GIRK1. Las corrientes GIRK son mediadas exclusivamente por iones K^+ por lo que su potencial de reversión depende exclusivamente de la concentración extracelular de este ión. A partir de curvas similares a la representada, en donde se muestra una significativa activación de la corriente a potenciales hiperpolarizados y una rectificación entrante a potenciales despolarizados, se estimaron los potenciales de reversión para las corrientes

GIRK. Los valores calculados para cada una de las variantes polimórficas del hD4R no mostraron diferencias significativas entre sí: -0.30 ± 0.28 mV para D4.2 (n=10); 0.78 ± 0.08 mV para D4.4 (n=4) y, 0.16 ± 0.42 mV para D4.7 (n=4) (N.S. ANOVA test, $p < 0.0001$). La aplicación de 100 nM DA indujo cambios en la pendiente de la curva I-V sin modificar los valores de potenciales de reversión.

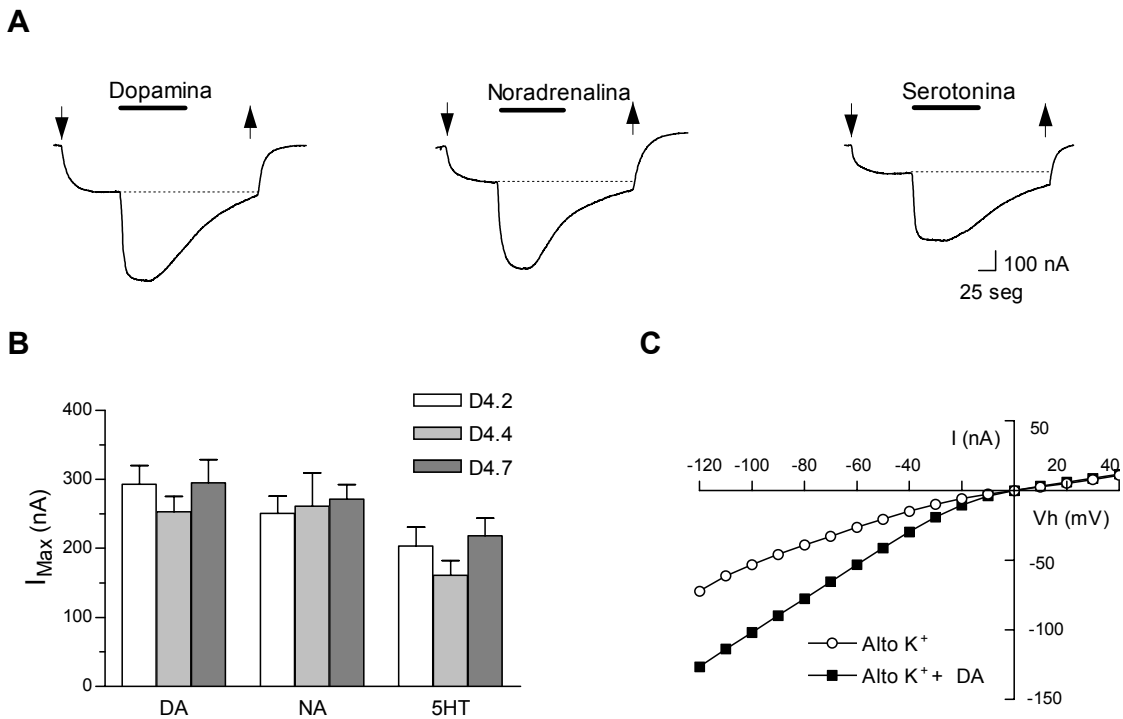


Figura 2.3: Activación del hD4R por diferentes monoaminas. A) Respuestas representativas en ovocitos co-inyectados D4.4 y GIRK1: La aplicación de DA (100 nM), NA (10 μ M) y 5HT (100 μ M) sobre el plateau de las corrientes iónicas mediadas por GIRK1, produjo incrementos significativos en la amplitud de las mismas. B) Corrientes máximas inducidas por DA (100 nM), NA (10 μ M) y 5HT (100 μ M) en ovocitos co-inyectados con GIRK1 y D4.2, D4.4 o D4.7 (n=8-18). C) Experimento representativo de la relación corriente-voltaje de las corrientes GIRK inducidas en alto K⁺, en presencia o ausencia de DA (100 nM), en ovocito co-inyectado con D4.4 y GIRK1. Las flechas indican el comienzo (\downarrow) y el final (\uparrow) de la perfusión con solución de alto K.

En algunos ovocitos, después de una prolongada aplicación de monoaminas (>60 segundos) y luego de que la amplitud de la corriente llegara a su máximo, se observó un rápido decaimiento de la respuesta que fue más evidente a concentraciones altas de agonista. Por esta razón se hicieron pruebas para minimizar el tiempo de exposición al agonista, demostrando que, aplicaciones de aproximadamente 30 segundos fueron suficientes para evocar la amplitud máxima de la corriente a una concentración dada (Fig.2.4). A partir de

este resultado se tuvo la precaución, en todos los experimentos, de realizar aplicaciones de agonista por no más de 30 segundos.

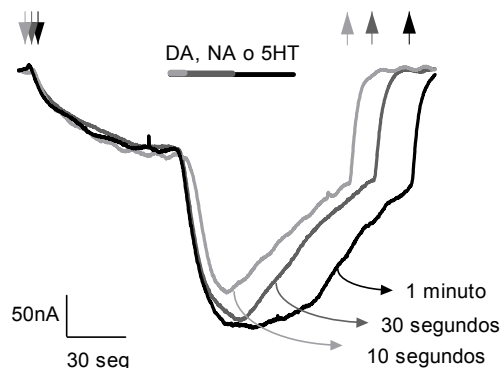


Figura 2.4: Tiempo mínimo de aplicación del agonista. En la figura se muestran tres trazos representativos de corrientes GIRK. Una vez evocadas a -100mV en alto K^+ , se mantuvo la perfusión de agonista durante tiempos diferentes (1 minuto, 30 y 10 segundos). Puede observarse que, se necesitan al menos 30 segundos de exposición al agonista, para evocar la máxima respuesta. Las flechas de colores grises y negro indican el comienzo (\downarrow) y el final (\uparrow) de la perfusión con solución de alto K^+ .

Análisis de curvas dosis-respuesta para DA, NA y 5HT sobre las distintas variantes polimórficas del hD4R.

Basándonos en los resultados mencionados anteriormente, decidimos profundizar aun más sobre la acción de las monoaminas en cada una de las variantes polimórficas del receptor. Para ello se construyeron curvas dosis-respuesta (D-R) para cada una de las variantes y se analizó el efecto de DA, NA y 5HT sobre la activación del hD4R. Como se muestra en la Fig.2.5, después de evocar la corriente GIRK manteniendo la membrana del ovocito a -100mV con solución de alto K^+ (corriente basal), se adicionó agonista (DA, NA o 5HT) al baño de perfusión, teniendo siempre la precaución de que la amplitud de la corriente llegara a un plateau y se mantuviera estable antes de cambiar a la concentración siguiente. De esta manera, se calcularon los valores de Dosis Efectiva 50 (EC_{50}) y el coeficiente de Hill (n Hill) para cada uno de los casos (Tabla I).

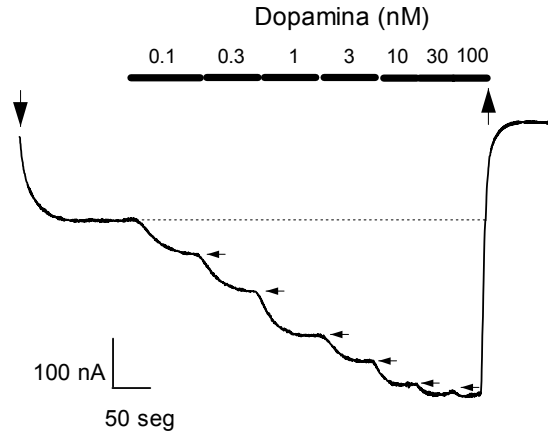


Figura 2.5: Efecto de la aplicación de concentraciones crecientes de DA. Registro representativo de la corriente de K^+ mediada por GIRK en respuesta a la aplicación de concentraciones crecientes de DA en un ovocito co-inyectado con D4.4 y GIRK1. Las flechas \leftarrow indican el plateau de la corriente alcanzada a una concentración dada. Las flechas indican el comienzo (\downarrow) y el final (\uparrow) de la perfusión con solución de alto K^+ .

Tabla I. Perfil farmacológico de dopamina, noradrenalina y serotonina

Variante polimórfica	DA		NA		5HT	
	EC ₅₀ (nM)	n Hill	EC ₅₀ (nM)	n Hill	EC ₅₀ (μM)	n Hill
D4.2	1.02 ± 0.06	0.74 ± 0.07	40.80 ± 0.97	0.83 ± 0.04	1.14 ± 0.09	1.14 ± 0.21
D4.4	4.89 ± 0.28	1.11 ± 0.17	43.50 ± 1.76	0.91 ± 0.07	1.42 ± 0.05	1.07 ± 0.11
D4.7	1.07 ± 0.04	0.92 ± 0.06	58.80 ± 2.31	0.81 ± 0.06	1.73 ± 0.06	0.76 ± 0.05

. Los datos se expresan como Media ± SEM de los EC₅₀ y n Hill obtenidos para DA, NA y 5HT en las distintas variantes polimórficas del hD4R (n= 5-17).

A fin de indagar sobre la eficacia máxima de los agonistas, se graficaron las curvas normalizando los valores obtenidos para NA y 5HT, respecto a valores de corriente máxima obtenidos para concentraciones saturantes de DA (100 nM) (Fig.2.6).

D4.2 y D4.7 fueron activados de manera similar por DA (EC₅₀=1.02 ± 0.06 nM, n=3-13 y 1.07 ± 0.04 nM, n=3-14 respectivamente; N.S. ANOVA, $p>0.05$), mientras que

D4.4 mostró menor sensibilidad (casi 5 veces menor) al neurotransmisor ($EC_{50}=4.89 \pm 0.28$ nM, $n=5-17$; S.D. ANOVA, $p<0.0001$). Los valores de n Hill calculados fueron cercanos a 1 (Tabla I), sugiriendo la presencia en el receptor, de un solo sitio de unión para las monoaminas. No se encontraron diferencias significativas en estos coeficientes cuando se comparó entre las distintas variantes del hD4R.

Por otro lado, los valores calculados de EC_{50} para NA mostraron que, D4.2 y D4.4 no difieren significativamente entre sí, pero si lo hacen con D4.7. (D4.2= 40.80 ± 0.97 nM, $n=3-10$; D4.4= 43.50 ± 1.76 nM, $n=3-12$ y D4.7= 58.80 ± 2.31 nM, $n=3-16$; S.D. ANOVA, $p<0.0001$).

La máxima respuesta a NA se alcanzó a $10 \mu\text{M}$ y fue muy similar a la máxima respuesta alcanzada por DA (D4.2= $102.05 \pm 1.00\%$; D4.4= $106.54 \pm 2.94\%$ y D4.7= $101.45 \pm 1.66\%$), revelando un comportamiento de agonista total para NA. Al igual que para DA, los valores de n Hill no mostraron diferencias entre las variantes.

Por otro lado, la respuesta a 5HT fue significativamente distinta entre las tres variantes del hD4R (D4.2= $1.14 \pm 0.1 \mu\text{M}$, $n=3-9$; D4.4= $1.42 \pm 0.05 \mu\text{M}$, $n=4-10$ y D4.7= $1.73 \pm 0.06 \mu\text{M}$, $n=5-14$; S.D. ANOVA, $p<0.0001$). 5HT se comportó como un agonista parcial del receptor. Su máxima respuesta (a $100 \mu\text{M}$), no superó el 75% de la respuesta máxima evocada por DA (D4.2= $65.88 \pm 3.28\%$; D4.4= $60.46 \pm 3.93\%$ y D4.7= $70.58 \pm 3.93\%$). Los valores calculados para el coeficiente de Hill no fueron diferentes entre si (Tabla I).

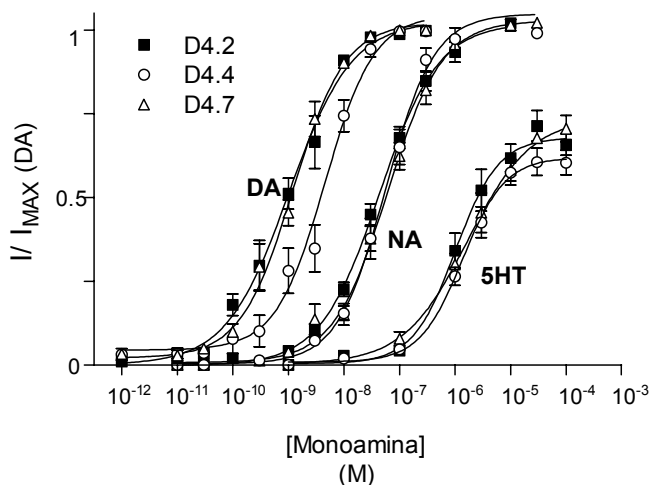


Figura 2.6: Efecto de DA, NA y 5HT sobre variantes polimórficas de hD4R. Curvas D-R para DA, NA y 5HT en ovocitos coinyectados con GIRK1 y D4.2, D4.4 o D4.7. La amplitud de las respuestas se expresa como fracción de las corrientes evocadas por 100 nM DA (Media \pm SEM).

Propiedades farmacológicas del hD4R

Tal como se describió, aparte de DA, NA y 5HT son capaces de activar el hD4R y, a través de él, modular la corriente de K^+ mediada por los canales GIRK1. Teniendo en cuenta estos resultados, decidimos evaluar la capacidad del antagonista específico para hD4R, PNU101387, para bloquear la acción de estas tres monoaminas sobre el receptor. La preincubación con 10 μ M PNU 101387 no produjo cambios en las propiedades eléctricas de la membrana de ovocitos inyectados solamente con ARNm de GIRK (Fig.2.7a). En tanto que, 1 μ M PNU101387 fue suficiente para bloquear casi por completo la acción de 1 nM DA, 50 nM NA (97 \pm 3 %, n= 3) y 1 μ M 5HT (100 \pm 4 % (n= 3) en aquellos ovocitos coinyectados con GIRK1 y D4.4 (Fig.2.7 b-d).

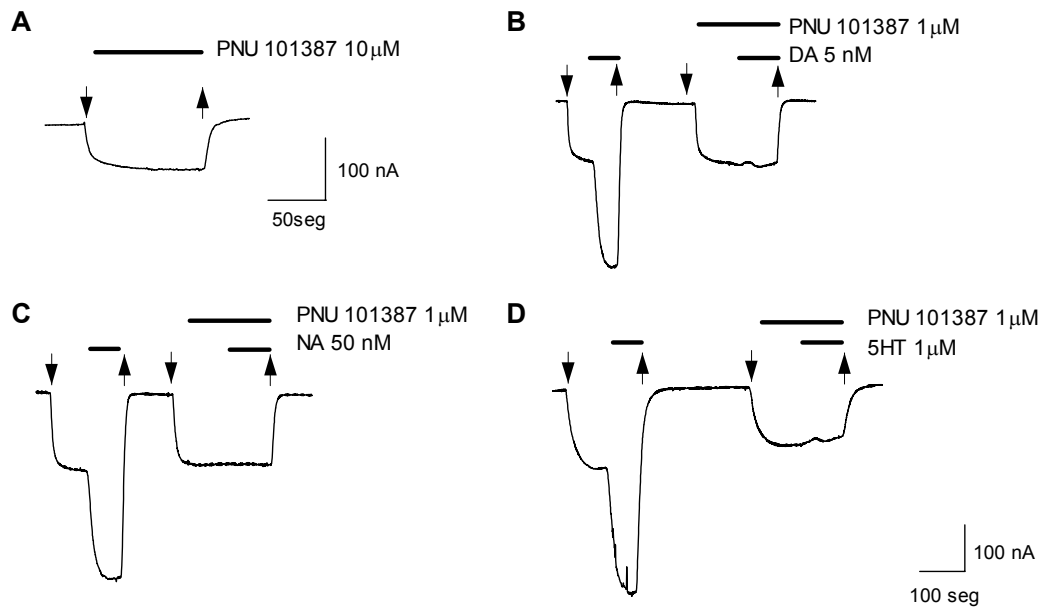


Figura 2.7: Efecto del antagonista específico PNU101387. A) Trazo representativo de la corriente evocada por alto K^+ en un ovocito inyectado solamente con ARNm de GIRK1. La preincubación (2 min) con PNU 101387 (10 μ M) no

produce ningún efecto en las propiedades eléctricas de la membrana del ovocito. B-D) Respuestas representativas mostrando el efecto de DA (1 nM), NA (50 nM) y 5HT (1 μ M) antes y después de la preincubación con el antagonista PNU 101387 (1 μ M). Las flechas indican el comienzo (\downarrow) y el final (\uparrow) de la perfusión con solución de alto K^+ .

Se construyeron curvas de inhibición con PNU101387 para las tres variantes del hD4R, solo en presencia de DA (Fig.2.8). La concentración de DA utilizada en estas curvas fue el valor aproximado de EC_{50} para cada variante (1nM para D4.2 y D4.7, y 5 nM para D4.4). Las tres variantes polimórficas mostraron la misma sensibilidad al antagonista (N.S ANOVA, $p>0.05$) y los valores de EC_{50} calculados fueron: 78.7 ± 8.73 nM (n=5); 60.8 ± 9.69 nM (n=9) y 47.2 ± 5.37 (n=5) para D4.2, D4.4 y D4.7 respectivamente. Los coeficientes de $nHill$ tampoco mostraron diferencias significativas entre las variantes (D4.2= 1.13 ± 0.17 , D4.4= 1.59 ± 0.44 y D4.7= 1.07 ± 0.16 ; N.S ANOVA, $p>0.05$).

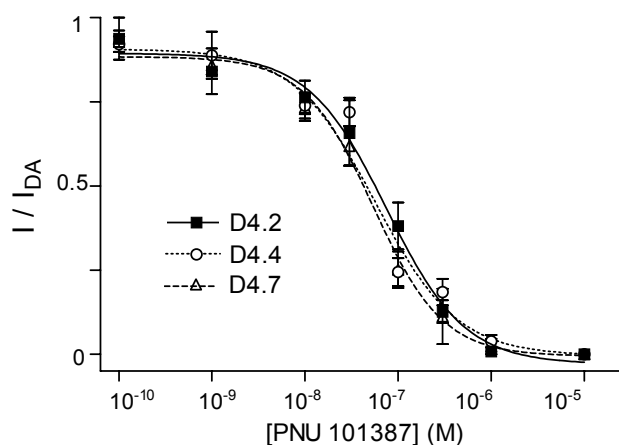


Figura 2.8: Efecto de PNU101387 sobre las variantes polimórficas del hD4R. Curvas de inhibición por PNU101387 realizada a la concentración correspondiente al EC_{50} de DA actuando sobre D4.2, D4.4 y D4.7. Cada punto representa la media \pm SEM (n= 2-9) El valor de la corriente fue normalizado a la respuesta evocada por DA (5 nM).

Como se observa, cuando PNU101387 se preincuba en el baño de perfusión, bloquea casi por completo los efectos de DA, NA y 5HT sobre la modulación de las corrientes GIRK mediadas por la activación del hD4R. Este resultado sugiere que las tres monoaminas testeadas se unen al mismo sitio del receptor para activarlo. Si esta hipótesis es correcta la 5HT, actuando como agonista parcial del hD4R, ejercería un efecto inhibitor de la respuesta máxima evocada a concentraciones saturantes de DA, mientras que tendría un efecto potenciador a concentraciones de DA cercanas al EC_{50} . Para testear esta hipótesis,

estudiamos la interacción DA-5HT, diseñando un experimento para evaluar la contribución de una concentración baja y otra alta de 5HT (1 μM y 100 μM respectivamente) sobre las corrientes de K^+ evocadas por DA. Al aplicar 1 μM 5HT sobre el pico de la corriente inducida por 1 nM DA, se observó un incremento del $15.7 \pm 0.6\%$ ($n=3$) en la amplitud de la corriente. Contrariamente a eso, cuando la respuesta máxima a DA (100 nM) fue evocada, la aplicación de una concentración saturante de 5HT (100 μM) produjo una disminución en la amplitud del $15.93 \pm 3.7\%$ ($n=4$) (Fig.2.9). Estos resultados concuerdan con los obtenidos de las curvas D-R, confirmando el papel de agonista parcial de 5HT sobre el hD4R. Tal como se observó, 5HT puede inhibir o potenciar los efectos de DA, dependiendo de la concentración relativa de ambas monoaminas.

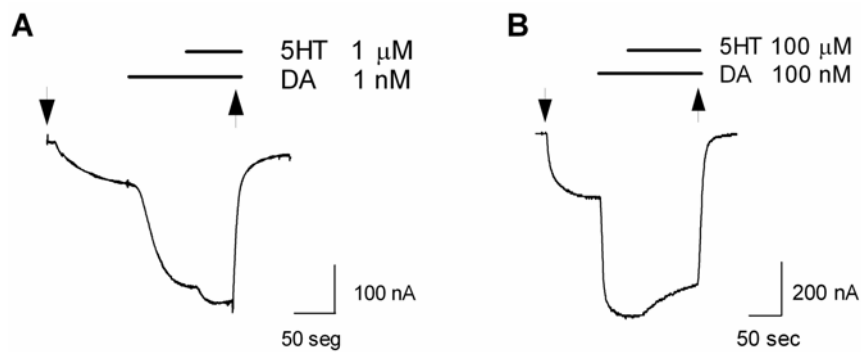


Figura 2.9: 5HT como agonista parcial sobre el hD4R. Registros representativos que ilustran el efecto de la aplicación conjunta de 5HT y DA (barras llenas) a diferentes concentraciones, en ovocitos co- inyectados con D4.4 y GIRK1. A) 5HT aumenta la respuesta de DA cuando ambas concentraciones son cercanas al EC_{50} . B) 5HT inhibe la respuesta a DA cuando las concentraciones de ambas monoaminas son saturantes. . Las flechas indican el comienzo (\downarrow) y el final (\uparrow) de la perfusión con solución de alto K^+ .

II.3 DISCUSIÓN

En esta segunda parte del trabajo de tesis se llevó a cabo la caracterización farmacológica y el análisis funcional de las tres variantes polimórficas más comunes del hD4R, a través de la coexpresión junto con canales GIRK1, en la membrana de ovocitos de *Xenopus laevis*. A continuación se discutirán algunos puntos relevantes derivados de los resultados obtenidos en este capítulo.

Relevancia funcional de las variantes polimórficas del hD4R

El gen humano del D4R muestra una extraordinaria variabilidad en la secuencia de codificación, con múltiples alelos polimórficos presentes en la población.

Recientemente, fue propuesto un modelo describiendo la evolución del gen humano D4R y el posible impacto fisiológico y bioquímico que pudieran ejercer las diferentes variantes polimórficas en la población (Wang et al., 2004). En los últimos años, numerosos trabajos se han focalizado en estudiar la posible asociación entre estos alelos y ciertas enfermedades neuropsiquiátricas tales como la Esquizofrenia o el Déficit de Atención e Hiperactividad (en inglés, ADHD) (Ebstein et al., 1996; Ebstein et al., 1997; Faraone et al., 1999). Por el contrario, no han sido tantos los trabajos centrados en estudiar el perfil farmacológico de estas variantes polimórficas y el rol que las mismas puedan jugar en la señalización de la neurotransmisión y, en última instancia, en la determinación de un comportamiento particular. Las propiedades farmacológicas y funcionales de los diversos subtipos de hD4R, que resultan de la heterogeneidad estructural del tercer dominio intracitoplasmático, aún no han sido claramente establecidas.

Como se mencionó en la introducción, diferencias funcionales entre algunas de las variantes polimórficas del hD4R que fueron previamente reportadas a través de ensayos *in vitro*, tales como acoplamiento con adenilato ciclasa mediado por DA, “*binding*” de clozapina o GTP γ S (Van Tol et al., 1992; Asghari et al., 1995; Jovanovic et al., 1999; Czermak et al., 2006). La gran variabilidad en los ensayos utilizados y las diferencias en las condiciones experimentales empleadas para estudiar las propiedades funcionales de las variantes del hD4R, complica considerablemente la interpretación de los resultados

publicados. Sin embargo, aún sin existir una relación lineal entre el largo del tercer dominio intracelular y una actividad farmacológica o funcional particular, la cantidad de repeticiones presentes en este dominio parecería estar afectando el perfil farmacológico del receptor. En nuestro trabajo demostramos que al ser activadas por DA, las variantes D4.2 y D4.7, además de acoplarse y modular eficientemente los canales de GIRK1, lo hacen con una potencia casi 5 veces mayor que la variante D4.4.

A fin de dilucidar la existencia de diferencias funcionales entre las distintas variantes polimórficas, se han realizado estudios abordando el tema desde diferentes puntos de vista. Recientemente, se ha demostrado que las secuencias repetidas presentes en el tercer dominio intracitoplasmático de las variantes del hD4R, son capaces de modular de manera diferencial la expresión del receptor, afectando la estabilidad del ARNm y/o la eficiencia de translación de la proteína hacia la membrana (Schoots and Van Tol, 2003). Por limitaciones técnicas, en nuestro modelo fue imposible cuantificar de manera directa el número de receptores expresados en la membrana del ovocito, por lo tanto, no podemos descartar que los resultados encontrados se deban a una expresión diferencial de alguna de las variantes polimórficas. Sin embargo, la menor sensibilidad a DA que muestra la variante D4.4 no parecería corresponderse con una menor expresión de ésta en la membrana ya que, si esto fuera cierto, deberían observarse diferencias en el mismo sentido cuando se activa el receptor con otros agonistas distintos a DA, como NA o 5HT (ver mas abajo y Fig.2.3b)

Participación del 3er dominio intracelular del receptor en la interacción con el canal GIRK1

Los resultados reportados en este trabajo muestran una directa asociación entre la activación de una variante polimórfica determinada, y un aumento en la amplitud de la corriente de K^+ mediada por GIRK1.

El modelo utilizado en este trabajo no nos permite establecer si, el aumento observado de la corriente de K^+ macroscópica, posterior a la activación del hD4R, se debe al incremento en el tiempo de apertura de los canales GIRK o, a la mayor disponibilidad de canales funcionalmente activos. Los canales GIRK poseen dominios de unión citosólicos para las subunidades $G\beta\gamma$, desde donde las mismas, ejercen la modulación del canal.

Recientemente se ha reportado la existencia de una relación directa entre el grado de ocupación de estos dominios por la subunidad $G\beta\gamma$ y el grado de activación del canal GIRK1 (Sadja et al., 2002). Cuando hay una baja ocupación de los sitios de unión para $G\beta\gamma$, se produce una activación parcial del canal. Por el contrario, cuando todos los sitios de unión están ocupados (cuatro) la activación es máxima, originándose un aumento significativo en la cantidad de corriente que conduce el canal. Además de las subunidades $G\beta\gamma$, una gran variedad de factores y procesos intracelulares son capaces de modular los canales GIRK (Sadja et al., 2003). Un ejemplo de esto es el fosfatidil-inositol-difosfato (PIP_2), cuya presencia estabiliza la interacción entre $G\beta\gamma$ y GIRK, provocando una activación persistente del canal (Kobrinisky et al., 2000; Lei et al., 2003). Se sabe que algunos de los receptores acoplados a proteína G (GPCRs), a través de la interacción con la proteína $G\alpha_q$, pueden activar la vía de la fosfolipasa C (PLC) que provoca la hidrólisis de PIP_2 y, de este modo, limitar la actividad estimuladora de $G\beta\gamma$ (Kobrinisky et al., 2000; Kelley et al., 2006). Hasta el momento no hay evidencias que demuestren una interacción específica de los hD4R con la proteína $G\alpha_q$ para activar la vía de la PLC, sin embargo esta interacción ya ha sido demostrada para receptores dopaminérgicos D3 y tipo-D1 (Newman-Tancredi et al., 1999). En este contexto, una posible explicación de los resultados obtenidos en este trabajo estaría asociada a la capacidad de cada variante del hD4R o, más estrictamente, a la capacidad de cada tercer dominio intracelular para interactuar diferencialmente con la proteína G modificando la disponibilidad de subunidades $G\beta\gamma$ o PIP_2 , cuya presencia, determinaría en parte, el tiempo de apertura del canal GIRK.

Acciones de dopamina, noradrenalina y serotonina en hD4R

La principal contribución de esta parte del trabajo es la demostración de que las tres principales monoaminas presentes en el cerebro son capaces de activar las variantes polimórficas más comunes del hD4R, utilizando aparentemente el mismo sitio de unión en el receptor. La comparación de las potencias relativas para DA, NA y 5HT sugiere un rol principal de la DA sobre la estimulación del hD4R. Sin embargo, teniendo en cuenta estudios previos y el rango dinámico de activación del hD4R por NA y 5HT observado en

nuestros experimentos, la contribución de estas monoaminas a la estimulación del hD4R en condiciones fisiológicas o patofisiológicas, merece ser discutida. En efecto, dado el nivel de promiscuidad existente entre el sistema de neurotransmisión monoaminérgico y los diferentes receptores, la hipótesis de que las monoaminas centrales puedan actuar como ligandos activando receptores no emparentados ha sido frecuentemente considerada (Lanau et al., 1997; Newman-Tancredi et al., 1997; Oz et al., 2003; Cornil et al., 2005; Czermak et al., 2006).

La capacidad de DA para modular las corrientes GIRK a través de la activación del hD4R, ha sido previamente descrita (Werner et al., 1996). Sorprendentemente, en un modelo similar al utilizado en este trabajo, DA es capaz de activar la variante D4.2 con una potencia casi 3 veces mayor que la reportada en nuestro trabajo para la misma variante. La discrepancia encontrada entre los valores calculados puede deberse a diferencias en la concentración de ARNm inyectado o quizás, al tipo específico de secuencias repetidas presentes en el tercer dominio intracelular; ambos detalles no especificados en el trabajo citado. Por otro lado, la fuerte interacción entre NA y hD4R ha sido previamente reportada (Lanau et al., 1997; Newman-Tancredi et al., 1997; Jovanovic et al., 1999; Czermak et al., 2006). En particular, NA, es capaz de unirse al hD4R con alta afinidad mostrando una eficacia relativa similar a DA en su capacidad para inducir la inhibición de la adenilato-ciclase (Jovanovic et al., 1999) y para estimular la unión a GTP γ S en la membrana de células CHO (Lanau et al., 1997; Newman-Tancredi et al., 1997). A pesar de haber utilizado un modelo experimental diferente, nuestros resultados coinciden con lo reportado anteriormente. En nuestro modelo, NA se comporta como agonista total y posee una eficacia relativa igual a DA para activar cualquiera de las tres variantes del hD4R utilizadas en este trabajo. Por el contrario, en un reporte recientemente publicado (Czermak et al., 2006), NA revela un comportamiento de agonista parcial evidenciando una eficacia relativa levemente menor a DA para estimular la unión con GTP γ S.

Con respecto a la potencia calculada para NA, la variabilidad de protocolos experimentales y la diferencia entre las variantes utilizadas en los distintos reportes, dificulta enormemente la comparación. Sin embargo, aunque difieren en su valor absoluto, el cociente entre las potencias relativas obtenidas en nuestro modelo experimental ($EC_{50}NA \sim 40-50nM/$

EC₅₀DA ~ 1-5 nM), se encuentra dentro del rango de los obtenidos en trabajos anteriores (Lanau et al., 1997; Czermak et al., 2006).

En este estudio, también demostramos la capacidad de 5HT para activar el receptor y modular indirectamente las corrientes de K⁺ mediadas por GIRK1. 5HT mostró una baja eficacia relativa por las distintas variantes del hD4R y una potencia significativamente menor a la de DA y NA para activar el receptor (EC₅₀5HT~ 1.5μM). Este hecho podría indicar que en condiciones fisiológicas normales, el hD4R raramente sería activado por 5HT. Sin embargo, han sido descritas interacciones neuroquímicas y fisiológicas complejas entre el sistema monoaminérgico central en varias regiones del cerebro y en diferentes condiciones (Seutin, 2005). Por ejemplo, recientemente se ha demostrado que los transportadores de DA, recaptan eficientemente 5HT cuando la concentración de ésta en el medio extracelular es elevada. De esta forma, las terminales dopaminérgicas estriatales, liberan conjuntamente DA y 5HT al medio extracelular (Zhou et al., 2005). El aumento de 5HT en el medio extracelular puede ocurrir luego de la administración crónica de drogas utilizadas en el tratamiento contra la ansiedad y la depresión (por ejemplo: fluoxetina) o bien luego del consumo de drogas de abuso (White et al., 1996; Carboni and Silvagni, 2004; Zhou et al., 2005). Otro ejemplo es la recaptación de DA por el transportador de NA seguido de la liberación conjunta de ambas monoaminas demostrada en las terminales noradrenérgicas de la CPF (Yamamoto and Novotney, 1998; Devoto et al., 2001; Carboni and Silvagni, 2004). Como ya fue mencionado, el hD4R se expresa en las neuronas e interneuronas piramidales situadas en las capas más profundas de la CPF (Mrzljak et al., 1996; Ariano et al., 1997), un área densamente inervada por neuronas dopaminérgicas, noradrenérgicas y serotoninérgicas (Emson and Koob, 1978; Reader, 1981; Goldman-Rakic, 1995b). Ha sido demostrado que los mismos somas celulares de las neuronas piramidales de esta área reciben terminales sinápticas convergentes de los tres sistemas monoaminérgicos en cuestión (Benes et al., 2000). Por lo tanto, la habilidad de estas tres monoaminas para interactuar con el hD4R puede llegar a tener consecuencias funcionales muy importantes.

Por último, existen numerosas evidencias que sugieren que, aunque se unan a un mismo sitio del receptor, distintos agonistas pueden inducir la formación de "estados activos" diferentes del receptor (Christopoulos and Kenakin, 2002). Estos "estados activos" son

conformaciones terciarias que exponen, de manera particular, los sitios de interacción con la proteína G presentes en los dominios intracitoplasmáticos. Es probable que la eficacia en la interacción con la proteína G, una vez activo el receptor, dependa no solo de la conformación inducida por el agonista, sino también del tipo de secuencias repetidas existentes en el tercer dominio intracelular y de la forma en que éstas interactúan con la proteína G.

En nuestros experimentos, DA es el único agonista que discrimina de una manera eficaz las distintas variantes polimórficas del hD4R (D4.4 es 5 veces menos sensible a DA que D4.2 y D4.7). A pesar de existir diferencias significativas entre las potencias calculadas para las distintas variantes cuando son activadas con NA o 5HT (ver Resultados), estas diferencias son pequeñas y las potencias no difieren más de 1.5 veces entre sí, lo cual indicaría que tanto NA como 5HT no discriminan de manera tan efectiva como lo hace DA entre las diferentes variantes polimórficas.

Una posible explicación de este resultado observado estaría relacionada con la capacidad de DA para generar una conformación terciaria específica del receptor que abarque regiones particulares del tercer dominio intracelular mientras que, las conformaciones terciarias inducidas por NA y 5HT no involucren a este dominio, de manera tal que la actividad funcional resultante del receptor no dependa del tipo de variante del cual se trate, o, lo que es lo mismo, del tipo de secuencias repetidas presentes en el tercer dominio.

En resumen, los resultados bioquímicos y farmacológicos encontrados en este trabajo aportan sólidas evidencias acerca de la interacción existente entre tres de las principales monoaminas y el hD4R que, como se ha observado, parecería actuar como un verdadero receptor monoaminérgico con afinidades diferentes para cada ligando.

REFERENCIAS

- Andersen PH, Gingrich JA, Bates MD, Dearry A, Falardeau P, Senogles SE, Caron MG (1990) Dopamine receptor subtypes: beyond the D1/D2 classification. *Trends Pharmacol Sci* 11:231-236.
- Ariano MA, Wang J, Noblett KL, Larson ER, Sibley DR (1997) Cellular distribution of the rat D4 dopamine receptor protein in the CNS using anti-receptor antisera. *Brain Res* 752:26-34.
- Asghari V, Sanyal S, Buchwaldt S, Paterson A, Jovanovic V, Van Tol HH (1995) Modulation of intracellular cyclic AMP levels by different human dopamine D4 receptor variants. *J Neurochem* 65:1157-1165.
- Asghari V, Schoots O, van Kats S, Ohara K, Jovanovic V, Guan HC, Bunzow JR, Petronis A, Van Tol HH (1994) Dopamine D4 receptor repeat: analysis of different native and mutant forms of the human and rat genes. *MolPharmacol* 46:364-373.
- Avale ME (2004) Desarrollo y estudio funcional de un modelo de hiperactividad en ratones con lesión dopaminérgica neonatal. In: *Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular*, pp 1-128. Buenos Aires: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- Azdad K, Piet R, Poulain DA, Oliet SH (2003) Dopamine D4 receptor-mediated presynaptic inhibition of GABAergic transmission in the rat supraoptic nucleus. *J Neurophysiol* 2003Apr23; .
- Baldessarini RJ, Tarazi FI (1996) Brain dopamine receptors: a primer on their current status, basic and clinical. *Harv Rev Psychiatry* 3:301-325.
- Barbas H, Blatt GJ (1995) Topographically specific hippocampal projections target functionally distinct prefrontal areas in the rhesus monkey. *Hippocampus* 5:511-533.
- Bargas J, Ayala GX, Hernandez E, Galarraga E (1998) Ca²⁺-channels involved in neostriatal glutamatergic transmission. *Brain Res Bull* 45:521-524.
- Beaulieu C (1993) Numerical data on neocortical neurons in adult rat, with special reference to the GABA population. *Brain Res* 609:284-292.

-
- Benes FM (1995) Altered glutamatergic and GABAergic mechanisms in the cingulate cortex of the schizophrenic brain. *Arch Gen Psychiatry* 52:1015-1018; discussion 1019-1024.
- Benes FM, Taylor JB, Cunningham MC (2000) Convergence and plasticity of monoaminergic systems in the medial prefrontal cortex during the postnatal period: implications for the development of psychopathology. *Cereb Cortex* 10:1014-1027.
- Berendse HW, Groenewegen HJ (1991) Restricted cortical termination fields of the midline and intralaminar thalamic nuclei in the rat. *Neuroscience* 42:73-102.
- Bergson C, Levenson R, Goldman-Rakic PS, Lidow MS (2003) Dopamine receptor-interacting proteins: the Ca(2+) connection in dopamine signaling. *Trends Pharmacol Sci* 24:486-492.
- Bergson C, Mrzljak L, Lidow MS, Goldman-Rakic PS, Levenson R (1995a) Characterization of subtype-specific antibodies to the human D5 dopamine receptor: studies in primate brain and transfected mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3468-3472.
- Bergson C, Mrzljak L, Smiley JF, Pappy M, Levenson R, Goldman-Rakic PS (1995b) Regional, cellular, and subcellular variations in the distribution of D1 and D5 dopamine receptors in primate brain. *J Neurosci* 15:7821-7836.
- Borst JG, Lodder JC, Kits KS (1994) Large amplitude variability of GABAergic IPSCs in melanotropes from *Xenopus laevis*: evidence that quantal size differs between synapses. *J Neurophysiol* 71:639-655.
- Branchereau P, Van Bockstaele EJ, Chan J, Pickel VM (1996) Pyramidal neurons in rat prefrontal cortex show a complex synaptic response to single electrical stimulation of the locus coeruleus region: evidence for antidromic activation and GABAergic inhibition using in vivo intracellular recording and electron microscopy. *Synapse* 22:313-331.
- Brodman (1909) *Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnhinde*. Leipzig.
- Carboni E, Silvagni A (2004) Dopamine reuptake by norepinephrine neurons: exception or rule? *Crit Rev Neurobiol* 16:121-128.
-

-
- Carr DB, O'Donnell P, Card JP, Sesack SR (1999) Dopamine terminals in the rat prefrontal cortex synapse on pyramidal cells that project to the nucleus accumbens. *J Neurosci* 19:11049-11060.
- Cauli B, Audinat E, Lambolez B, Angulo MC, Ropert N, Tsuzuki K, Hestrin S, Rossier J (1997) Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. *J Neurosci* 17:3894-3906.
- Clark D, White FJ (1987) D1 dopamine receptor--the search for a function: a critical evaluation of the D1/D2 dopamine receptor classification and its functional implications. *Synapse* 1:347-388.
- Connors BW, Gutnick MJ (1990) Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons. *Trends Neurosci* 13:99-104.
- Cornil CA, Dejace C, Ball GF, Balthazart J (2005) Dopamine modulates male sexual behavior in Japanese quail in part via actions on noradrenergic receptors. *Behav Brain Res* 163:42-57.
- Czermak C, Lehofer M, Liebmann PM, Traynor J (2006) [35S]GTPgammaS binding at the human dopamine D4 receptor variants hD4.2, hD4.4 and hD4.7 following stimulation by dopamine, epinephrine and norepinephrine. *Eur J Pharmacol* 531:20-24.
- Chang FM, Kidd JR, Livak KJ, Pakstis AJ, Kidd KK (1996) The world-wide distribution of allele frequencies at the human dopamine D4 receptor locus. *Hum Genet* 98:91-101.
- Christopoulos A, Kenakin T (2002) G protein-coupled receptor allosterism and complexing. *Pharmacol Rev* 54:323-374.
- Dahlstroem A, Fuxe K (1964) Evidence for the Existence of Monoamine-Containing Neurons in the Central Nervous System. I. Demonstration of Monoamines in the Cell Bodies of Brain Stem Neurons. *Acta Physiol Scand Suppl:SUPPL 232:231-255*.
- 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.
- Daniels J, Williams J, Mant R, Asherson P, McGuffin P, Owen MJ (1994) Repeat length variation in the dopamine D4 receptor gene shows no evidence of association with schizophrenia. *Am J Med Genet* 54:256-258.
-

-
- Defagot MC, Falzone TL, Low MJ, Grandy DK, Rubinstein M, Antonelli MC (1997) Quantitative analysis of the dopamine D4 receptor in the mouse brain. *J NeurosciRes* 2000Jan15;59(2):202-8 59:202-208.
- DeFelipe J, Alonso-Nanclares L, Arellano JI (2002) Microstructure of the neocortex: comparative aspects. *J Neurocytol* 31:299-316.
- Degenetais E, Thierry AM, Glowinski J, Gioanni Y (2002) Electrophysiological properties of pyramidal neurons in the rat prefrontal cortex: an in vivo intracellular recording study. *Cereb Cortex* 12:1-16.
- Devoto P, Flore G, Pani L, Gessa GL (2001) Evidence for co-release of noradrenaline and dopamine from noradrenergic neurons in the cerebral cortex. *Mol Psychiatry* 6:657-664.
- Di Chiara G (1995) The role of dopamine in drug abuse viewed from the perspective of its role in motivation. *Drug Alcohol Depend* 38:95-137.
- Diaz J, Levesque D, Griffon N, Lammers CH, Martres MP, Sokoloff P, Schwartz JC (1994) Opposing roles for dopamine D2 and D3 receptors on neurotensin mRNA expression in nucleus accumbens. *Eur J Neurosci* 6:1384-1387.
- Ding DC, Gabbott PL, Totterdell S (2001) Differences in the laminar origin of projections from the medial prefrontal cortex to the nucleus accumbens shell and core regions in the rat. *Brain Res* 917:81-89.
- Dudel J, Kuffler SW (1961) Presynaptic inhibition at the crayfish neuromuscular junction. *J Physiol* 155:543-562.
- Ebstein RP, Nemanov L, Klotz I, Gritsenko I, Belmaker RH (1997) Additional evidence for an association between the dopamine D4 receptor (D4DR) exon III repeat polymorphism and the human personality trait of Novelty Seeking. *Mol Psychiatry* 2:472-477.
- Ebstein RP, Novick O, Umansky R, Priel B, Osher Y, Blaine D, Bennett ER, Nemanov L, Katz M, Belmaker RH (1996) Dopamine D4 receptor (D4DR) exon III polymorphism associated with the human personality trait of Novelty Seeking. *Nat Genet* 12:78-80.
- Emson PC, Koob GF (1978) The origin and distribution of dopamine-containing afferents to the rat frontal cortex. *Brain Res* 142:249-267.
-

-
- Falzone TL, Gelman DM, Young JJ, Grandy DK, Low MJ, Rubinstein M (2002) Absence of dopamine D4 receptors results in enhanced reactivity to unconditioned, but not conditioned, fear. *Eur J Neurosci* 2002 Jan;15(1):158-64 15:158-164.
- Faraone SV, Biederman J, Weiffenbach B, Keith T, Chu MP, Weaver A, Spencer TJ, Wilens TE, Frazier J, Cleves M, Sakai J (1999) Dopamine D4 gene 7-repeat allele and attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry* 156:768-770.
- Fishburn CS, Carmon S, Fuchs S (1995) Molecular cloning and characterisation of the gene encoding the murine D4 dopamine receptor. *FEBS Lett* 361:215-219.
- Friedman A, Gutnick MJ (1989) Intracellular Calcium and Control of Burst Generation in Neurons of Guinea-Pig Neocortex in Vitro. *Eur J Neurosci* 1:374-381.
- Fuster JM (1997) *The Prefrontal Cortex: Anatomy, Physiology, and Neuropsychology of the Frontal Lobe.*: Lippincott-Raven.
- Fuster JM (2001) The prefrontal cortex-an update: time is of the essence. *Neuron* 30:319-333.
- Fuxe K, Wikstrom AC, Okret S, Agnati LF, Harfstrand A, Yu ZY, Granholm L, Zoli M, Vale W, Gustafsson JA (1985) Mapping of glucocorticoid receptor immunoreactive neurons in the rat tel- and diencephalon using a monoclonal antibody against rat liver glucocorticoid receptor. *Endocrinology* 117:1803-1812.
- Gan L, Falzone TL, Zhang K, Rubinstein M, Baldessarini RJ, Tarazi FI (2004) Enhanced expression of dopamine D(1) and glutamate NMDA receptors in dopamine D(4) receptor knockout mice. *J Mol Neurosci* 22:167-178.
- Goldman-Rakic PS (1995a) Cellular basis of working memory. *Neuron* 14:477-485.
- Goldman-Rakic PS (1995b) Anatomical and functional circuits in prefrontal cortex of nonhuman primates. Relevance to epilepsy. *Adv Neurol* 66:51-65.
- Goldman-Rakic PS, Leranth C, Williams SM, Mons N, Geffard M (1989) Dopamine synaptic complex with pyramidal neurons in primate cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:9015-9019.
- Graybiel AM (1990) Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci* 13:244-254.
- Groenewegen HJ, Uylings HB (2000) The prefrontal cortex and the integration of sensory, limbic and autonomic information. *Prog Brain Res* 126:3-28.
-

-
- Groenewegen HJ, Wright CI, Uylings HB (1997) The anatomical relationships of the prefrontal cortex with limbic structures and the basal ganglia. *J Psychopharmacol* 11:99-106.
- 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.
- Huang Q, Zhou D, Chase K, Gusella JF, Aronin N, DiFiglia M (1992) Immunohistochemical localization of the D1 dopamine receptor in rat brain reveals its axonal transport, pre- and postsynaptic localization, and prevalence in the basal ganglia, limbic system, and thalamic reticular nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:11988-11992.
- Jaber M, Robinson SW, Missale C, Caron MG (1996) Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology* 35:1503-1519.
- Jackson DM, Westlind-Danielsson A (1994) Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. *Pharmacol Ther* 64:291-370.
- Jovanovic V, Guan HC, Van Tol HH (1999) Comparative pharmacological and functional analysis of the human dopamine D4.2 and D4.10 receptor variants. *Pharmacogenetics* 9:561-568.
- Kawaguchi Y, Kondo S (2002) Parvalbumin, somatostatin and cholecystokinin as chemical markers for specific GABAergic interneuron types in the rat frontal cortex. *J Neurocytol* 31:277-287.
- Kebabian JW, Calne DB (1979) Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277:93-96.
- Kelley GG, Kaproth-Joslin KA, Reks SE, Smrcka AV, Wojcikiewicz RJ (2006) G-protein-coupled receptor agonists activate endogenous phospholipase Cepsilon and phospholipase Cbeta3 in a temporally distinct manner. *J Biol Chem* 281:2639-2648.
- Kelly MA, Rubinstein M, Asa SL, Zhang G, Saez C, Bunzow JR, Allen RG, Hnasko R, Ben-Jonathan N, Grandy DK, Low MJ (1997) Pituitary lactotroph hyperplasia and chronic hyperprolactinemia in dopamine D2 receptor-deficient mice. *Neuron* 19:103-113.
- Kobrinisky E, Mirshahi T, Zhang H, Jin T, Logothetis DE (2000) Receptor-mediated hydrolysis of plasma membrane messenger PIP2 leads to K⁺-current desensitization. *Nat Cell Biol* 2:507-514.
-

-
- Kohn Y, Ebstein RP, Heresco-Levy U, Shapira B, Nemanov L, Gritsenko I, Avnon M, Lerer B (1997) Dopamine D4 receptor gene polymorphisms: relation to ethnicity, no association with schizophrenia and response to clozapine in Israeli subjects. *Eur Neuropsychopharmacol* 7:39-43.
- Kondo S, Kawaguchi Y (2001) Slow synchronized bursts of inhibitory postsynaptic currents (0.1-0.3 Hz) by cholinergic stimulation in the rat frontal cortex in vitro. *Neuroscience* 107:551-560.
- LaHoste GJ, Swanson JM, Wigal SB, Glabe C, Wigal T, King N, Kennedy JL (1996) Dopamine D4 receptor gene polymorphism is associated with attention deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 1:121-124.
- Lambe EK, Krimer LS, Goldman-Rakic PS (2000) Differential postnatal development of catecholamine and serotonin inputs to identified neurons in prefrontal cortex of rhesus monkey. *J Neurosci* 20:8780-8787.
- Lanau F, Zenner MT, Civelli O, Hartman DS (1997) Epinephrine and norepinephrine act as potent agonists at the recombinant human dopamine D4 receptor. *J Neurochem* 68:804-812.
- Le Moine C, Bloch B (1995) D1 and D2 dopamine receptor gene expression in the rat striatum: sensitive cRNA probes demonstrate prominent segregation of D1 and D2 mRNAs in distinct neuronal populations of the dorsal and ventral striatum. *J Comp Neurol* 355:418-426.
- Le Moine C, Normand E, Guitteny AF, Fouque B, Teoule R, Bloch B (1990) Dopamine receptor gene expression by enkephalin neurons in rat forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:230-234.
- Lei Q, Jones MB, Talley EM, Garrison JC, Bayliss DA (2003) Molecular mechanisms mediating inhibition of G protein-coupled inwardly-rectifying K⁺ channels. *Mol Cells* 15:1-9.
- 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.
-

-
- Lewis DA, Sesack SR, Levey AI, Rosenberg DR (1998) Dopamine axons in primate prefrontal cortex: specificity of distribution, synaptic targets, and development. *Adv Pharmacol* 42:703-706.
- Lichter JB, Barr CL, Kennedy JL, Van Tol HH, Kidd KK, Livak KJ (1993) A hypervariable segment in the human dopamine receptor D4 (DRD4) gene. *Hum Mol Genet* 2:767-773.
- McCormick DA, Connors BW, Lighthall JW, Prince DA (1985) Comparative electrophysiology of pyramidal and sparsely spiny stellate neurons of the neocortex. *J Neurophysiol* 54:782-806.
- Mei YA, Griffon N, Buquet C, Martres MP, Vaudry H, Schwartz JC, Sokoloff P, Cazin L (1995) Activation of dopamine D4 receptor inhibits an L-type calcium current in cerebellar granule cells. *Neuroscience* 68:107-116.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78:189-225.
- Mrzljak L, Bergson C, Pappy M, Huff R, Levenson R, Goldman-Rakic PS (1996) Localization of dopamine D4 receptors in GABAergic neurons of the primate brain. *Nature* 381:245-248.
- Newman-Tancredi A, Audinot-Bouchez V, Gobert A, Millan MJ (1997) Noradrenaline and adrenaline are high affinity agonists at dopamine D4 receptors. *Eur J Pharmacol* 319:379-383.
- Newman-Tancredi A, Cussac D, Audinot V, Pasteau V, Gavaudan S, Millan MJ (1999) G protein activation by human dopamine D3 receptors in high-expressing Chinese hamster ovary cells: A guanosine-5'-O-(3-[³⁵S]thio)- triphosphate binding and antibody study. *Mol Pharmacol* 55:564-574.
- 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.
- O'Hearn E, Molliver ME (1984) Organization of raphe-cortical projections in rat: a quantitative retrograde study. *Brain Res Bull* 13:709-726.
-

-
- Oz M, Zhang L, Rotondo A, Sun H, Morales M (2003) Direct activation by dopamine of recombinant human 5-HT1A receptors: comparison with human 5-HT2C and 5-HT3 receptors. *Synapse* 50:303-313.
- Partridge JG, Apparsundaram S, Gerhardt GA, Ronesi J, Lovinger DM Nicotinic acetylcholine receptors interact with dopamine in induction of striatal long-term depression. *J Neurosci* 2002Apr1;22(7):2541-9 22:2541-2549.
- Paxinos G, Watson C (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Sydney: Academic Press.
- Petrides M, Pandya DN (1984) Projections to the frontal cortex from the posterior parietal region in the rhesus monkey. *J Comp Neurol* 228:105-116.
- Price CJ, Pittman QJ (2000) Dopamine D4 receptor activation inhibits presynaptically glutamatergic neurotransmission in the rat supraoptic nucleus. *J Neurophysiol* 2001 Sep;86(3):1149-55 86:1149-1155.
- Ray JP, Price JL (1993) The organization of projections from the mediodorsal nucleus of the thalamus to orbital and medial prefrontal cortex in macaque monkeys. *J Comp Neurol* 337:1-31.
- Reader TA (1981) Distribution of catecholamines and serotonin in the rat cerebral cortex: absolute levels and relative proportions. *J Neural Transm* 50:13-27.
- Rietschel M, Nothen MM, Lannfelt L, Sokoloff P, Schwartz JC, Lanczik M, Fritze J, Cichon S, Fimmers R, Korner J, et al. (1993) A serine to glycine substitution at position 9 in the extracellular N-terminal part of the dopamine D3 receptor protein: no role in the genetic predisposition to bipolar affective disorder. *Psychiatry Res* 46:253-259.
- 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.
- Robbins TW (2000) From arousal to cognition: the integrative position of the prefrontal cortex. *Prog Brain Res* 126:469-483.
- Rubinstein M, Cepeda C, Hurst RS, Flores-Hernandez J, Ariano MA, Falzone TL, Kozell LB, Meshul CK, Bunzow JR, Low MJ, Levine MS, Grandy DK (2001) Dopamine D4 receptor-deficient mice display cortical hyperexcitability. *J Neurosci* 21:3756-3763.
-

-
- Rubinstein M, Phillips TJ, Bunzow JR, Falzone TL, Dziewczapolski G, Zhang G, Fang Y, Larson JL, McDougall JA, Chester JA, Saez C, Pugsley TA, Gershanik O, Low MJ, Grandy DK (1997) Mice lacking dopamine D4 receptors are supersensitive to ethanol, cocaine, and methamphetamine. *Cell* 90:991-1001.
- Sadja R, Alagem N, Reuveny E (2002) Graded contribution of the Gbeta gamma binding domains to GIRK channel activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10783-10788.
- Sadja R, Alagem N, Reuveny E (2003) Gating of GIRK channels: details of an intricate, membrane-delimited signaling complex. *Neuron* 39:9-12.
- Schoots O, Van Tol HH (2003) The human dopamine D4 receptor repeat sequences modulate expression. *Pharmacogenomics J*.
- Seeman P, Guan HC, Van Tol HH (1993) Dopamine D4 receptors elevated in schizophrenia. *Nature* 365:441-445.
- Senogles SE, Heimert TL, Odife ER, Quasney MW (2004) A region of the third intracellular loop of the short form of the D2 dopamine receptor dictates Gi coupling specificity. *J Biol Chem* 279:1601-1606.
- Sesack SR, Carr DB (2002) Selective prefrontal cortex inputs to dopamine cells: implications for schizophrenia. *Physiol Behav* 77:513-517.
- Sesack SR, Snyder CL, Lewis DA (1995) Axon terminals immunolabeled for dopamine or tyrosine hydroxylase synapse on GABA-immunoreactive dendrites in rat and monkey cortex. *J Comp Neurol* 363:264-280.
- Seutin V (2005) Dopaminergic neurones: much more than dopamine? *Br J Pharmacol* 146:167-169.
- Sibley DR, Monsma FJ, Jr. (1992) Molecular biology of dopamine receptors. *Trends Pharmacol Sci* 13:61-69.
- Silva LR, Amitai Y, Connors BW (1991) Intrinsic oscillations of neocortex generated by layer 5 pyramidal neurons. *Science* 251:432-435.
- Smiley JF, Levey AI, Ciliax BJ, Goldman-Rakic PS (1994) D1 dopamine receptor immunoreactivity in human and monkey cerebral cortex: predominant and extrasynaptic localization in dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:5720-5724.
-

-
- Somogyi P, Tamas G, Lujan R, Buhl EH (1998) Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. *Brain Res Brain Res Rev* 26:113-135.
- Spitzer NC (1991) A developmental handshake: neuronal control of ionic currents and their control of neuronal differentiation. *J Neurobiol* 22:659-673.
- Steriade M (2004) Neocortical cell classes are flexible entities. *Nat Rev Neurosci* 5:121-134.
- Steriade M, Timofeev I, Grenier F (2001) Natural waking and sleep states: a view from inside neocortical neurons. *J Neurophysiol* 85:1969-1985.
- Swanson J, Castellanos FX, Murias M, LaHoste G, Kennedy J (1998) Cognitive neuroscience of attention deficit hyperactivity disorder and hyperkinetic disorder. *Curr Opin Neurobiol* 8:263-271.
- Takagishi M, Chiba T (1991) Efferent projections of the infralimbic (area 25) region of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tracer PHA-L study. *Brain Res* 566:26-39.
- Takahashi T, Forsythe ID, Tsujimoto T, Barnes-Davies M, Onodera K (1996) Presynaptic calcium current modulation by a metabotropic glutamate receptor. *Science* 274:594-597.
- Tarazi FI, Kula NS, Baldessarini RJ (1997) Regional distribution of dopamine D4 receptors in rat forebrain. *Neuroreport* 8:3423-3426.
- Tarazi FI, Tomasini EC, Baldessarini RJ (1998) Postnatal development of dopamine D4-like receptors in rat forebrain regions: comparison with D2-like receptors. *Brain Res Dev Brain Res* 110:227-233.
- Tiberi M, Jarvie KR, Silvia C, Falardeau P, Gingrich JA, Godinot N, Bertrand L, Yang-Feng TL, Fremeau RT, Jr., Caron MG (1991) Cloning, molecular characterization, and chromosomal assignment of a gene encoding a second D1 dopamine receptor subtype: differential expression pattern in rat brain compared with the D1A receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7491-7495.
- Van Tol HH, Bunzow JR, Guan HC, Sunahara RK, Seeman P, Niznik HB, Civelli O (1991) Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* 350:610-614.
-

-
- Van Tol HH, Wu CM, Guan HC, Ohara K, Bunzow JR, Civelli O, Kennedy J, Seeman P, Niznik HB, Jovanovic V (1992) Multiple dopamine D4 receptor variants in the human population. *Nature* 358:149-152.
- Vertes RP (2004) Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* 51:32-58.
- Vincent SL, Khan Y, Benes FM (1993) Cellular distribution of dopamine D1 and D2 receptors in rat medial prefrontal cortex. *J Neurosci* 13:2551-2564.
- Vincent SL, Khan Y, Benes FM (1995) Cellular colocalization of dopamine D1 and D2 receptors in rat medial prefrontal cortex. *Synapse* 19:112-120.
- Wang E, Ding YC, Flodman P, Kidd JR, Kidd KK, Grady DL, Ryder OA, Spence MA, Swanson JM, Moyzis RK (2004) The genetic architecture of selection at the human dopamine receptor D4 (DRD4) gene locus. *Am J Hum Genet* 74:931-944.
- Wang X, Zhong P, Yan Z (2002) Dopamine D4 receptors modulate GABAergic signaling in pyramidal neurons of prefrontal cortex. *J Neurosci* 22:9185-9193.
- Wang X, Zhong P, Gu Z, Yan Z (2003) Regulation of NMDA receptors by dopamine D4 signaling in prefrontal cortex. *J Neurosci* 23:9852-9861.
- Wang Z, Zheng P (2001) Characterization of spontaneous excitatory synaptic currents in pyramidal cells of rat prelimbic cortex. *Brain Res* 2001 May18;901(1-2):303-13 901:303-313.
- Weinberger DR (1987) Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 44:660-669.
- Werner P, Hussy N, Buell G, Jones KA, North RA (1996) D2, D3, and D4 dopamine receptors couple to G protein-regulated potassium channels in *Xenopus* oocytes. *MolPharmacol* 49:656-661.
- White SR, Obradovic T, Imel KM, Wheaton MJ (1996) The effects of methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "Ecstasy") on monoaminergic neurotransmission in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 49:455-479.
- Wilke RA, Hsu SF, Jackson MB (1998) Dopamine D4 receptor mediated inhibition of potassium current in neurohypophysial nerve terminals. *J PharmacolExpTher* 284:542-548.
-

-
- Williams SR, Stuart GJ (1999) Mechanisms and consequences of action potential burst firing in rat neocortical pyramidal neurons. *J Physiol* 521 Pt 2:467-482.
- Yamamoto BK, Novotney S (1998) Regulation of extracellular dopamine by the norepinephrine transporter. *J Neurochem* 71:274-280.
- Yang CR, Seamans JK, Gorelova N (1996) Electrophysiological and morphological properties of layers V-VI principal pyramidal cells in rat prefrontal cortex in vitro. *J Neurosci* 16:1904-1921.
- Zhou FM, Hablitz JJ (1996) Layer I neurons of rat neocortex. I. Action potential and repetitive firing properties. *J Neurophysiol* 76:651-667.
- Zhou FM, Liang Y, Salas R, Zhang L, De Biasi M, Dani JA (2005) Corelease of dopamine and serotonin from striatal dopamine terminals. *Neuron* 46:65-74.

CONCLUSIONES

Tomados en conjunto, los resultados de esta tesis nos permiten arribar a las siguientes conclusiones principales:

Capítulo I:

1. DA produce efectos excitatorios e inhibitorios sobre la excitabilidad de las NPLV en rebanadas de la CPF.
2. El número de NPLV en donde la DA ejerce un efecto inhibitorio se reduce drásticamente en la CPF de ratones D4^{-/-}.
3. Las acciones excitatorias de DA fueron significativamente más frecuentes en la CPF de ratones D4^{-/-}.
4. Quinpirole disminuyó la frecuencia de disparo de potenciales de acción en las NPLV de la CPF de ratones D4^{+/+} y D4^{-/-}. Estos resultados sugieren la participación de D2Rs en el control de la excitabilidad en estas células.
5. Nuestros resultados son compatibles con un rol inhibitorio postsináptico de los D4Rs sobre la excitabilidad de las NPLV

Capítulo II:

1. Las tres variantes polimórficas más comunes del D4R humano, una vez activadas, son capaces de modular las corrientes de K⁺ GIRK1.
 2. Además de DA y NA; 5HT es capaz de modular positivamente las corrientes de K⁺ GIRK a través de la activación de D4.2, D4.4 y D4.7, siendo, sin embargo, significativamente menos potente sobre el receptor que las dos primeras.
-

-
3. 5HT actúa como agonista parcial, mientras que DA y NA lo hacen como agonistas totales.
 4. De las tres monoaminas estudiadas, DA es la que muestra la mayor diferencia en la afinidad aparente entre las 3 variantes polimórficas, siendo casi 5 veces más afín por D4.2 y D4.7 que por D4.4.
 5. El antagonista selectivo PNU101387 previene completamente el efecto de DA, NA y 5HT, sugiriendo que las 3 monoaminas se unen a la misma región del receptor para activarlo.
 6. 5HT puede potenciar o inhibir la respuesta evocada por DA sobre los hD4R, dependiendo de la concentración relativa de ambos neurotransmisores

Furthermore, small variations in the 48 bp repeat units themselves contribute to additional variability. Currently, 18 different variants of repeat units, identified by the letters α to ζ , have been described (Fig. 1). In total, 27 different haplotypes have been recognized. These 27 different receptor variants encode 20 different proteins, since some of the repeat unit variants harbour silent mutations (Van Tol *et al.*, 1992; Lichter *et al.*, 1993; Asghari *et al.*, 1994). This high variability in the coding sequence has been hypothesized to underlie pharmacological heterogeneity in drug and/or biolog-
