

## Tesis Doctoral

# Estudio funcional del receptor dopaminérgico D2 en el sistema nervioso central mediante el uso de ratones mutantes inducibles

Bello Gay, Estefanía Pilar

2012

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Bello Gay, Estefanía Pilar. (2012). Estudio funcional del receptor dopaminérgico D2 en el sistema nervioso central mediante el uso de ratones mutantes inducibles. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Bello Gay, Estefanía Pilar. "Estudio funcional del receptor dopaminérgico D2 en el sistema nervioso central mediante el uso de ratones mutantes inducibles". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Estudio funcional del receptor dopaminérgico D2 en el sistema nervioso central mediante el uso de ratones mutantes inducibles**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas por

Estefanía Pilar Bello Gay

Director de tesis: Dr. Marcelo Rubinstein

Consejero de Estudios: Dr. Marcelo Rubinstein

Lugar de trabajo: Instituto en Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular

(INGEBI)

Buenos Aires, 2012

## RESUMEN

### **Estudio funcional del receptor dopaminérgico D2 (D2R) en el sistema nervioso central mediante el uso de ratones mutantes inducibles**

Liberaciones subóptimas o excesivas de dopamina son rasgos característicos de varias patologías muy frecuentes que incluyen a la enfermedad de Parkinson, esquizofrenia, desorden de déficit atencional e hiperactividad (ADHD) y autoadministración compulsiva de drogas de abuso. En este trabajo se estudió el rol del D2R mediante la generación de ratones mutantes condicionales. En primer lugar, generamos ratones deficientes de D2R en las neuronas dopaminérgicas (autorreceptores). Estos ratones tienen la síntesis y liberación de dopamina aumentada, son hiperactivos e hipersensibles a los efectos psicomotores de la cocaína, y tienen mayor motivación para trabajar por la comida. En segundo lugar, estudiamos los efectos de la pérdida de D2Rs en animales adultos que se habían desarrollado normalmente en comparación con ratones deficientes en D2Rs constitutivos que desarrollan programas compensatorios tempranos. La abrupta remoción de los D2R en la adultez provocó una marcada disminución de la locomoción, problemas severos en el aprendizaje y la coordinación de rutinas motoras. En algunos casos, se observó rigidez y temblor en los animales en reposo con características de parkinsonismo. Los resultados obtenidos, demostraron la importancia de la estricta regulación mediada por los D2R (pre y postsinápticos) en el control de la actividad locomotora, la sensibilidad a drogas de abuso y el estado motivacional de los animales.

**Palabras clave:** - dopamina, receptores D2, autorreceptor, ratones mutantes, motivación -

## **ABSTRACT**

### **Functional study of the dopamine D2 receptor (D2R) in the central nervous system by inducible mutant mice**

Suboptimal or excessive dopamine (DA) release are characteristic of a number of very common diseases, including Parkinson's disease, schizophrenia, attention deficit disorder with hyperactivity (ADHD) and compulsive self-administration of drugs of abuse. In this paper, we study the role of D2R by generating mutant mice. First, we generated mice lacking D2R in dopaminergic neurons (autoreceptors). These mice have increased dopamine synthesis and release, are hyperactive and hypersensitive to the psychomotor effects of cocaine, and show enhanced motivation to work for food. Second, we generated a model that allows us to eliminate D2R of adult animals normally developed. The abrupt removal of the D2R in adulthood causes a marked decrease in locomotion, severe learning problems and motor coordination routines. In some cases, it can induce rigidity and tremor at rest. These results demonstrate the importance of the strict regulation mediated by the D2R (pre and postsynaptic) in the control of locomotor activity, sensitivity to drugs of abuse and particularly in the motivational state of animals.

**Key words:** - dopamine, D2 receptors, autoreceptor, mutant mice, motivation -

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad de Buenos Aires, por la educación gratuita y de excelencia que permitió mi formación académica y profesional durante todos estos tantos años.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por permitir que me dedique exclusivamente a mi formación científica gracias a su beca doctoral.

Al Instituto en Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular que facilitó sus instalaciones y calidad humana donde desarrollar este trabajo.

A Marcelo, por darme la oportunidad de formar parte de su laboratorio, por la formación que me diste, por facilitarme los medios para realizar la tesis, por las oportunidades, por compartir tu experiencia, por los consejos, el apoyo, el empuje, el afecto, por escucharme y aceptarme como soy.

A mis compañeros de laboratorio, por enseñarme, por soportarme y quererme, por compartir conmigo tantos años de esfuerzo y dedicación siempre a la par y con una sonrisa haciéndome sentir que valía la pena.

A Dani Noaín, por ser mi "madre laboratoril", por enseñarme más que el ABC de nuestro trabajo, por el tiempo y la paciencia que me dedicaste, por mostrarme el camino.

A Vani, por enseñarme el amor por los ratones, por estar siempre ayudándome, empujándome y bancándome para seguir adelante codo a codo, por ser la mejor compañera.

A Maru, por ser la luz de las mañanas, por tu paciencia, tus mimos y tu sabiduría.

A Vivi, por ayudarme en tantos momentos, por compartir tus ideas, por los consejos, por enseñarme, por soportarme con tantos ratones, por la confianza, por tu complicidad, por tu cariño.

A Flávs, por charlarme todos los días y pelearme cuando hiciera falta, por soportarme del otro lado cotidianamente, por los consejos, por tu conocimiento infinito y tu alegría brasilera.

A Sabi, por la dulzura, las charlas, las alegrías y las tristezas compartidas, las diversas aventuras emprendidas, por escucharme y estar siempre.

A Sofi, por enseñarme a no enroscarme en todo, por enseñar con el ejemplo, por el buen humor constante y la paz que transmitís, por tu ingenio y alegría, por compartir tu doctorado conmigo.

A Rama, por ayudarme con tanta paciencia tantas veces y perderla otras, por tu gran compañerismo, por desfiarme, por tu amistad desde el primer día, por tus ojitos azules.

A Rodrigo y a Eric por su gran ayuda y disposición 100%, por su paciencia, por escucharme siempre como si supiera, por el buen humor, por su gran dedicación; les paso la posta...

A Sergio, por prestarme tu mesada, por enseñarme cosas difíciles y estar siempre bien predispuesto a las consultas, por los mates y el buen humor.

A Gretel, por compartirme sus clases de danza, por ayudarme tantas veces y siempre que lo necesité.

A Lucía F, por la buena onda, las charlas y por recibirme en su casa siempre con una sonrisa.

A Dani O, por su siempre buena predisposición y alegría, por compartir los grandes partiditos de fútbol.

A Irina, por su paciencia, las charlas y por cuidar a los babies.

A Diego Gelman, por hacer los ratones *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>*.

A David Lovinger, Verónica Álvarez, Yolanda Mateo y Jung Shin.

A Gloria Levin.

A Malcolm Low.

A Gregorio Galiñanes.

A Gustavo Murer, por la excelente disposición para ayudar, por la confianza y los consejos

A los ratones.

A Rubén, por la increíble disposición y paciencia para ayudarnos siempre en cualquier cosa que se nos ocurra.

A mucha gente que me ayudó desinteresadamente: Belén Elgoyhen, Betina González, Briardo Llorente, Camila Zold, Caro Wedemeyer, Chris Cunningham, Claudia García Bonelli, Dani Calvo, Daniel, Daniela Faccennini, Daniel Olazábal, Diego Weinger, Eleonora Katz, Francisco Pancho, Gladys, Guille Alonso, Ine Pérez-Millán, Irene Taravini, Irma Gelmi, Jérica U, Jime Ballester, José,

José Luis Ferrán, Juan Belforte, Leonel Jonnas, Laura González, Leti Niborski, Margarita, Marta, Martín La Rosa, Maru Gómez-Casati, Mary, Matías Fassolari, Mirtha Flawiá, Natalia Bercovich, Norberto Malarini, Norma, Romina Fox, Tamara Salem y Tomás Duffy.

A Ceci, Marce y Javi por compartir muchas tardes de mates salvadores.

Al Doc, por sus palabras.

A Adrián Gaspari, por ayudarme en y con los arranques de la tesis, las charlas y las divagaciones, por la paciencia y pasión con la que me escuchaste y acompañaste en estos momentos.

A Silvia y Ricardo, por estar siempre al pie del cañón, apoyándonos en todos los proyectos con amor.

A Ana, Caro, Dani, Lau y Lour, por quererme, bancarme todos estos años de doctorado hablando de ratones y ciencia, y apoyarme en todos mis proyectos.

A mis amigos de la Facu, por seguir cerca y hacerme amar esta carrera.

A mis hermanos, por hacerme sentir que donde sea que estén es mi lugar en el mundo.

A mi mamá y a mi papá, por quererme y enseñarme a querer así de tanto, por todas las oportunidades que me dieron, por permitirme elegir mi destino y enseñarme a pelear con pasión por él, por apoyarme siempre incondicionalmente en todo, por el amor infinito que nos dan.

A mi mamá, por su inmensa ayuda con la corrección de la tesis.

A Fran, por amarme, por la comprensión, esfuerzo y paciencia con la que soportaste la escritura de esta tesis, por bancarme durante todos estos años de trabajo especialmente en épocas difíciles, acompañándome firme y dándome aliento en todas las etapas, por animarte a todo juntos, por ser el mejor compañero y haberme elegido para compartir tu vida.

Muchas gracias.

## DEDICATORIA

A mamá y papá.

A mi amor.



# ÍNDICE

<b>RESUMEN .....</b>	<b>2</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>3</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>4</b>
<b>DEDICATORIA.....</b>	<b>7</b>
<b>ÍNDICE .....</b>	<b>8</b>
<b>CONSIDERACIONES PRELIMINARES .....</b>	<b>12</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>13</b>
1. La neurotransmisión dopaminérgica .....	13
1.1. La importancia de la neurotransmisión dopaminérgica .....	13
1.2. Síntesis, liberación y degradación de la dopamina.....	13
Biosíntesis de la Dopamina .....	13
Liberación de dopamina.....	14
Terminación de la neurotransmisión dopaminérgica.....	15
Degradación de dopamina.....	16
2. Los sistemas dopaminérgicos centrales .....	17
2.1. La vía nigroestriatal.....	17
2.2. Las vías mesocortical y mesolímbica: .....	18
2.3. La vía tuberoinfundibular .....	19
3. Los receptores dopaminérgicos.....	19
3.1. Clasificación .....	19
3.2. Localización.....	21
3.3. Estructura .....	22
3.4. Propiedades Farmacológicas .....	23
4. El circuito de los ganglios de la base.....	24
4.1. Anatomía y fisiología.....	24
4.2. Funciones de los ganglios de la base .....	27
4.3. El papel modulador de la dopamina en el estriado.....	30
5. La dopamina .....	32
5.1. Dopamina y el circuito de la recompensa .....	33
5.2. Dopamina y motivación .....	35
5.3. Dopamina y adicción.....	36
Tolerancia .....	39
Sensibilización .....	40

<b>OBJETIVOS GENERALES DE LA TESIS .....</b>	<b>46</b>
<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>47</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>48</b>
Liberación y recaptación de dopamina.....	48
Control de la liberación de dopamina por receptores presinápticos. Autorreceptores. ....	49
Liberación .....	50
Síntesis .....	51
Actividad neuronal.....	51
Heterorreceptores .....	52
Desbalances de la neurotransmisión dopaminérgica.....	53
<b>Objetivos .....</b>	<b>54</b>
Objetivos generales .....	54
Objetivos específicos.....	54
<b>Resultados.....</b>	<b>55</b>
Generación de ratones sin autoreceptores D2 .....	55
<sup>Box 1</sup> Caracterización de la expresión de <i>Cre</i> en ratones <i>DAT<sup>+/iresCre</sup></i> .....	57
<sup>Box 2</sup> Caracterización inicial de los ratones autoDrd2KO.....	58
Caracterización general del modelo autoDrd2KO .....	59
Caracterización neuroquímica.....	59
Liberación y síntesis de dopamina mediadas por autoreceptores D2 .....	61
Análisis de la actividad locomotora .....	63
Funcionalidad de los autoreceptores <i>in vivo</i> .....	66
Conductas relacionadas con conflictos de aproximación/evitación.....	67
Efecto del haloperidol.....	69
Funcionalidad del DAT .....	70
Sensibilidad a la cocaína.....	71
Sensibilización a la cocaína .....	73
Motivación para trabajar por la comida .....	76
<b>Conclusiones y Discusión .....</b>	<b>80</b>
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>89</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>90</b>
Alteraciones en las funciones de los ganglios basales.....	91
Control del comportamiento orientado a objetivos y automatizado.....	92
<b>Objetivos .....</b>	<b>95</b>

Objetivos generales .....	95
Objetivos específicos.....	95
<b>Resultados .....</b>	<b>96</b>
Generación de ratones mutantes inducibles para el receptor D2 .....	96
<sup>Box 3</sup> Puesta a punto de la edad y tiempo de administración .....	99
Determinación del esquema de trabajo .....	100
Evaluación de los niveles de recombinación del gen <i>Drd2</i> .....	101
Análisis de la actividad locomotora espontánea .....	102
Análisis de la coordinación motora.....	106
Entrenamiento intensivo sobre un <i>rotarod</i> en ausencia de receptores D2.....	107
Participación del D2R en la ejecución de conductas motoras .....	108
Respuesta al haloperidol .....	109
Respuesta a la amfetamina .....	111
<sup>Box 4</sup> Postura corporal en ausencia de D2R.....	112
<b>Conclusiones y Discusión .....</b>	<b>113</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>119</b>
Animales y Bioterio .....	119
Generación de líneas de ratones mutantes .....	119
Mantenimiento de los ratones .....	119
Genotipificación de los animales de las diferentes colonias .....	120
Extracción de ADN.....	120
Reacciones de PCR con <i>primers</i> específicos .....	120
Preparación y procesamiento de tejidos.....	122
Perfusión.....	122
Obtención de secciones en vibrátomo.....	122
Obtención de secciones en crióstato.....	123
Hibridación in situ con ribosondas radioactivas .....	123
Hibridación <i>in situ</i> con ribosondas marcadas con dioxigenina .....	124
Ensayos de unión específica con radioligandos.....	126
Inmunohistoquímica e Inmunofluorescencia en cortes flotantes .....	126
Fotografías.....	128
Determinación de L-DOPA.....	128
Experimentos conductuales.....	129
Locomoción en cajas de actividad .....	129
<i>Rotarod</i> .....	129
Capítulo 1.....	129
Capítulo 2.....	129

Test de luz/oscuridad .....	130
Test del objeto novedoso .....	130
Condicionamiento de preferencia de lugar (CPP).....	130
Tarea de tasa fija.....	131
Tarea de tasa progresiva .....	132
Preparación y administración de drogas.....	133
Gráficos y estadística.....	135
<b>APÉNDICE.....</b>	<b>136</b>
Métodos.....	136
Electrofisiología .....	136
Voltametría cíclica de barrido rápido (FSCV).....	136
Figura Suplementaria 1 .....	137
Figura Suplementaria 2 .....	138
Figura Suplementaria 3 .....	139
Figura Suplementaria 4 .....	140
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>141</b>

## CONSIDERACIONES PRELIMINARES

El presente trabajo de tesis doctoral tiene por objeto estudiar la funcionalidad de receptores de dopamina D2 en ratones. El estudio de estos receptores *in vivo* ha presentado limitaciones debido a la falta de compuestos selectivos que sean capaces de discriminar entre los distintos subtipos de receptores dopaminérgicos. En los últimos años se ha utilizado una alternativa experimental basada en técnicas de genética molecular: la generación de líneas de ratones mutantes, deficientes en receptores D2 que resultaron herramientas muy fructíferas para asignar funciones a estos receptores. Sin embargo, el análisis de los fenotipos de ratones con alelos nulos para el receptor D2 encontró dificultades para interpretar los resultados debido a la presencia de múltiples fenotipos superpuestos (centrales y periféricos) y, en especial, a la aparición de programas alternativos de desarrollo que tienden a compensar la ausencia de receptores D2 funcionales. En este trabajo se introdujeron mutaciones condicionales en los genes del receptor D2 que permiten controlar el sitio y el momento de la inducción de la mutación, lo que permite estudiar su función con mayor precisión.

Este escrito consta de una Introducción general y luego dos capítulos bien diferenciados, cada uno con una introducción específica, resultados y discusión. En el primer capítulo, se estudió el rol de los receptores D2 presinápticos en la regulación de la neurotransmisión dopaminérgica central y su influencia en distintos aspectos del comportamiento. Algunos de los resultados serán mostrados en figuras suplementarias del Apéndice. En el segundo capítulo, se compararon los efectos de la pérdida de los D2R en animales adultos respecto de los mutantes clásicos  $Drd2^{-/-}$  que tienden a compensar la pérdida temprana del receptor D2 para luego determinar cuál es el mejor modelo animal donde estudiar la función de este receptor. En la sección de resultados de ambos capítulos, se incluyen resultados preliminares o consideraciones complementarias en forma de recuadros a los que llamamos "box".

# INTRODUCCIÓN GENERAL

## 1. La neurotransmisión dopaminérgica

### 1.1. La importancia de la neurotransmisión dopaminérgica

La dopamina es un neurotransmisor perteneciente a la familia de las catecolaminas, que participa en diversas funciones del sistema nervioso central de los mamíferos, tales como la regulación de la acción motora, los procesos cognitivos y emocionales, los mecanismos de recompensa, la regulación neuroendocrina, el sueño, la atención y el aprendizaje.

Desde su descubrimiento como neurotransmisor del sistema nervioso central en el año 1958 por Arvid Carlsson, los sistemas dopaminérgicos han sido foco de innumerables investigaciones, debido fundamentalmente a la gran cantidad de funciones que desempeñan y, en consecuencia, a la existencia de una gran cantidad de patologías humanas asociadas con su disfunción. Entre ellas se destacan, la enfermedad de Parkinson, una de las enfermedades neurodegenerativas más comunes de la vejez (2 % de los individuos >65 años); la esquizofrenia, con una elevada tasa de prevalencia en la juventud (1-1,5 %); el Déficit de Atención e Hiperactividad (ADHD), cuyos síntomas aparecen durante la niñez (3-7 % de niños) y las patologías adictivas (drogas, comida, juego, etc.) cuya prevalencia en las sociedades modernas aumenta en cada década. Estas patologías se desarrollan prácticamente por igual en todas las regiones del mundo y en todas las clases sociales. Aún hoy, debido a la importancia de las funciones que realiza, la dopamina es objeto de nuevos estudios que continúan ampliando el conocimiento de esta importante molécula y de los circuitos neuronales donde participa.

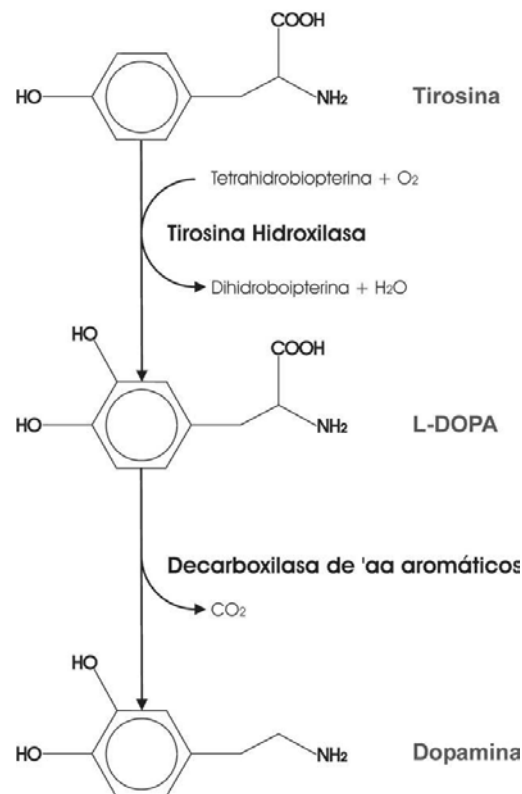
### 1.2. Síntesis, liberación y degradación de la dopamina

#### Biosíntesis de la Dopamina

La dopamina, la norepinefrina (NE) y la epinefrina (E) son las tres catecolaminas con función biológica conocida en el sistema nervioso de los vertebrados. Poseen una estructura química común consistente en un anillo catecol unido a un grupo amino lateral y comparten las primeras etapas de su vía biosintética.

La biosíntesis de la dopamina comienza cuando el aminoácido L-tirosina es convertido en el intermediario L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) por la enzima tirosina hidroxilasa (TH) (Figura 1). Éste es el paso limitante en la biosíntesis de las catecolaminas (Zigmond *et al.*

1989). Luego, una enzima llamada decarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC) transforma rápidamente L-DOPA en el producto final, la dopamina, mediante la eliminación del grupo carboxilo. En las células noradrenérgicas la presencia de la enzima dopamina-β-hidroxilasa convierte a la dopamina en NE; y ésta, a su vez, será convertida a E por la enzima feniletanolamina N-metiltransferasa en las células adrenérgicas.



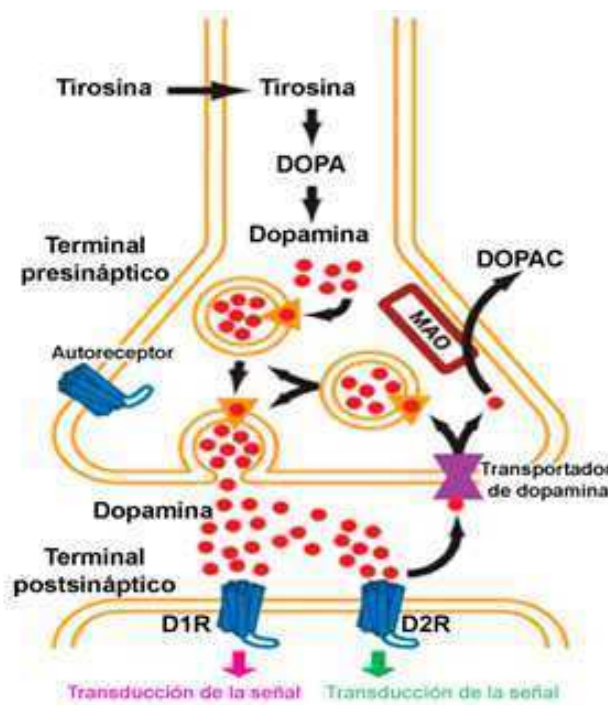
**Figura 1. Vía biosintética de la dopamina.** A través de la tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante en la biosíntesis de las catecolaminas, el aminoácido L-tirosina se transforma en L-DOPA, para luego decarboxilarse mediante la DOPA-decarboxilasa, generando dopamina.

### Liberación de dopamina

Luego de ser sintetizada, la dopamina es inmediatamente almacenada en vesículas (Figura 2). La dopamina es incorporada en las vesículas a través de un transportador de alta afinidad (VMAT2), que funciona acoplado a una bomba de H<sup>+</sup> dependiente de la hidrólisis de ATP (Schuldiner, 1994) que introduce una molécula de dopamina al interior de la vesícula acoplada al transporte de dos protones en contra de gradiente. Cuando un potencial de acción produce la despolarización del terminal sináptico, se abren los canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje presentes en el terminal, y la consiguiente entrada de Ca<sup>2+</sup>

extracelular promueve la fusión de las vesículas con la membrana sináptica provocando la descarga del neurotransmisor al espacio sináptico (Figura 2).

La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular regula el contenido cuántico de dopamina liberado. El  $\text{Ca}^{2+}$  entra a las neuronas por canales tipo N y P/Q que se encuentran tanto en los terminales axónicos como en las dendritas (Chen *et al.*, 2006; Beckstead *et al.*, 2007). En las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio hay canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo  $\text{CaV1.3}$  regulando la actividad espontánea tipo marcapaso de estas neuronas (Nedergaard *et al.*, 1993; Chan *et al.*, 2007).



**Figura 2. Liberación de dopamina en el espacio sináptico.** La dopamina sintetizada en el terminal es incorporada en las vesículas a través del transportador vesicular VMAT2. La liberación de dopamina se produce por el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  generado por la llegada de un potencial de acción, que promueve la unión de las vesículas a la membrana celular. La dopamina, una vez liberada, actúa sobre los receptores presinápticos (autorreceptores) y sobre los receptores dopaminérgicos postsinápticos D1 y D2 (D1R y D2R). El transportador de dopamina (DAT) produce una rápida internalización de la dopamina, que una vez recaptada es degradada por la monoaminooxidasa (MAO) al metabolito DOPAC.

### Terminación de la neurotransmisión dopaminérgica

El proceso más eficiente que da fin a la transmisión dopaminérgica, se produce a través del



transportador de dopamina (DAT) presente en el terminal presináptico (Figura 2). El DAT se localiza en el soma, las dendritas, los axones y los terminales axónicos de las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio (Nirenberg *et al.*, 1996).

El DAT reincorpora la dopamina extracelular dependiendo de un gradiente de  $\text{Na}^+$  (Amara y Kuhar, 1993). Una vez recaptada, la dopamina puede ser nuevamente almacenada en las vesículas para su reutilización, o ser degradada por la enzima monoamina oxidasa (MAO; Figura 2).

Las drogas psicoestimulantes, como el metilfenidato y la cocaína, actúan bloqueando el DAT y por lo tanto inducen un aumento dramático de la concentración de dopamina extracelular. La anfetamina en cambio, penetra al terminal a través del DAT y bloquea al VMAT2, provocando un aumento en la concentración de dopamina intracelular no incorporada a las vesículas, la cual se libera a través del DAT a favor de gradiente (Jones *et al.*, 1998a).

Existen receptores dopaminérgicos de "tipo D2" que funcionan como autorreceptores limitando la liberación de dopamina, la síntesis y la actividad neuronal (Rice *et al.*, 2011). Una descripción detallada de su funcionamiento se encuentra en el Capítulo 1.

### **Degradación de dopamina**

Los mecanismos de degradación de la dopamina (DA) involucran la deaminación oxidativa por medio de la monoamina oxidasa (MAO) y la O-metilación mediante la catecol O-metiltransferasa (COMT). Las vías de degradación dependen de la compartimentalización de las enzimas metabólicas que se encuentran en diferentes células y tejidos. La dopamina recaptada dentro del terminal es degradada por la MAO, una enzima que se encuentra en las mitocondrias (Figura 2). Existen dos isoenzimas capaces de degradar monoaminas, la MAO-A y la MAO-B, que se diferencian por la especificidad celular y de tejido. La MAO-A tiene mayor afinidad por la noradrenalina y la serotonina en tanto que la MAO-B es la isoforma con mayor afinidad por la dopamina. El producto final de la acción de la MAO sobre la dopamina es el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC).

La dopamina presente en el espacio sináptico (extracelular) también puede ser degradada por intermedio de la COMT, una enzima que se expresa en la membrana extracelular, y

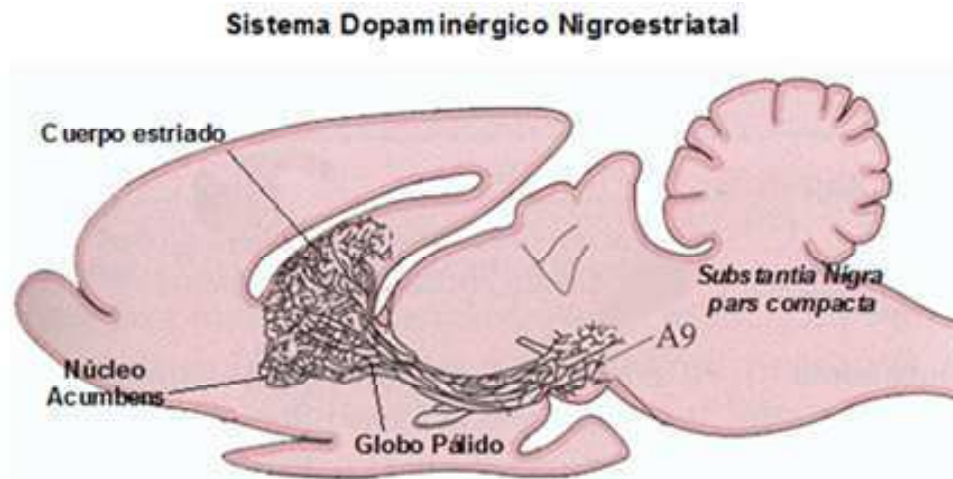
cuyo metabolito es la 3-O-metildopamina, que también es sustrato de la MAO intracelular que la convierte en ácido homovainílico (HVA). La determinación de la relación DOPAC/DA y HVA/DA se utiliza experimentalmente como medida del metabolismo de las neuronas dopaminérgicas, ya que representan la relación de la dopamina que fue liberada del terminal con respecto al contenido total de dopamina.

## **2. Los sistemas dopaminérgicos centrales**

El sistema dopaminérgico central de los mamíferos está comprendido por cuatro vías neuronales principales (Dahlstrom y Fuxe, 1964): la vía nigroestriatal (A9) (Figura 3), la vía mesocortical y mesolímbica (A10) y la vía túbero-infundibular (A12); (Figura 4).

### **2.1. La vía nigroestriatal**

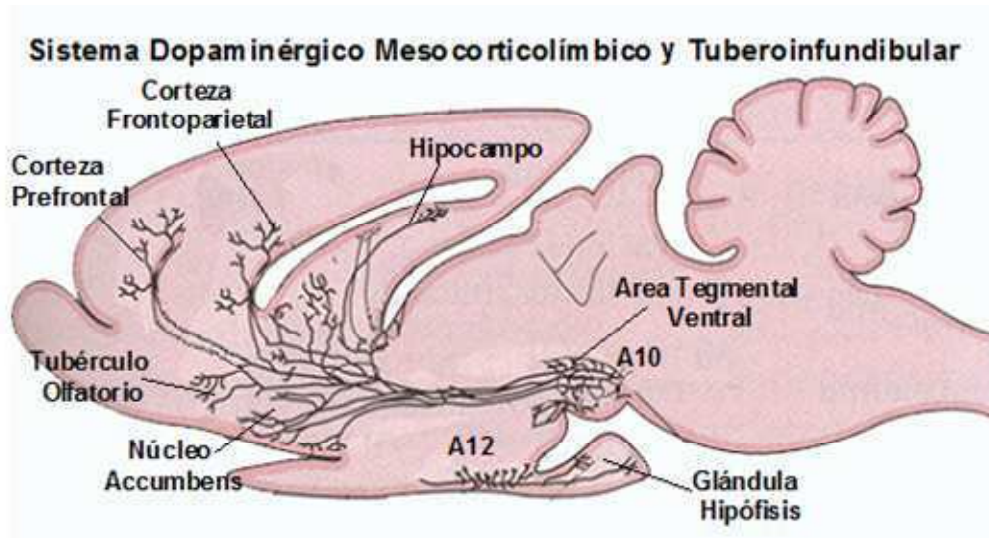
La vía nigroestriatal (A9) está formada por las neuronas que proyectan desde la zona compacta de la sustancia nigra (SNpc) del cerebro medio hacia el estriado (o caudado-putamen), y producen el 70 % de la dopamina del cerebro (Figura 3). En los ganglios de la base, la dopamina cumple un papel fundamental en el planeamiento, iniciación y coordinación de los movimientos voluntarios y de los comportamientos complejos (Graybiel, 1990). La degeneración de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales conduce a los síntomas de la enfermedad de Parkinson, que se caracteriza por temblor, rigidez postural y dificultad para iniciar y controlar el movimiento. Estos síntomas se manifiestan cuando el contenido de dopamina estriatal disminuye por debajo del 25 % (Hornykiewicz, 1970). El papel de la dopamina en el funcionamiento del circuito de los ganglios de la base será descrito en mayor detalle más adelante, en la **sección 4**.



**Figura 3. Sistema dopaminérgico nigroestriatal.** Las neuronas de la vía dopaminérgica nigroestriatal presentan los cuerpos celulares en la sustancia nigra *pars compacta* (A9), en el cerebro medio y proyectan sus axones hacia el estriado. Adaptado de Fuxe et al. (1985).

## 2.2. Las vías mesocortical y mesolímbica:

El tracto mesocorticolímbico (A10) se origina en el área tegmental ventral del cerebro medio y luego se divide en las vías dopaminérgica mesocortical y mesolímbica (Figura 4). El sistema mesocortical proyecta principalmente hacia la corteza prefrontal, la corteza cingulada y la corteza entorrinal. Estas áreas corticales están relacionadas con funciones emocionales, motivacionales y cognitivas cuya disfunción se vincula a la etiología de varias enfermedades psiquiátricas como la esquizofrenia (Seeman, 1987; Carlsson, 1988). El sistema mesolímbico proyecta hacia otras zonas del cerebro anterior como el núcleo accumbens, el tubérculo olfatorio, la amígdala y la corteza piriforme. El sistema mesolímbico es la vía final común de los circuitos de recompensa, placer y gratificación y, en sus formas patológicas, de comportamientos compulsivos, adicción a drogas de abuso y droga-dependencia. Estimulantes psicomotores como la cocaína y las anfetaminas, los narcóticos opioides como la heroína y la morfina, así como el etanol y la nicotina son todas drogas adictivas que producen sus efectos gratificantes de euforia y placer a través de la estimulación del sistema dopaminérgico mesolímbico (Di Chiara *et al.*, 1992, 2004; Cunningham *et al.*, 2000; Risinger *et al.*, 2000). El papel de la dopamina en los circuitos de recompensa y la adicción será descrito más adelante en la **sección 6.3**.



**Figura 4. Sistema dopaminérgico mesocorticolímbico y tuberoinfundibular.** El sistema mesocorticolímbico posee los cuerpos celulares en el área tegmental ventral (A10) y proyecta hacia el núcleo accumbens, el tubérculo olfatorio, la corteza prefrontal y corteza entorrinal, entre otros. La vía más corta tuberoinfundibular (A12) se origina en el núcleo arcuato del hipotálamo e inerva la hipófisis a través de la circulación portal. Adaptado de Dahlström y Fuxe (1985).

### 2.3. La vía tuberoinfundibular

El tracto tuberoinfundibular (A12) es un sistema neuroendócrino compuesto por neuronas más cortas, ubicadas en el núcleo arcuato del hipotálamo que proyectan hacia el lóbulo intermedio de la hipófisis y hacia el final de la eminencia media donde se encuentran los vasos portales que irrigan la hipófisis anterior (Figura 4). La dopamina liberada por este núcleo regula la síntesis y liberación de péptidos derivados de la proopiomelanocortina y la prolactina, respectivamente. Las alteraciones de esta vía neuroendocrina modifican la liberación de hormonas hipofisarias generando problemas metabólicos y de fertilidad, y pueden conducir al desarrollo de tumores hipofisarios (Kelly *et al.*, 1997).

## 3. Los receptores dopaminérgicos

### 3.1. Clasificación

Todos los receptores dopaminérgicos pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) y realizan una transmisión sináptica lenta a diferencia de los receptores ionotrópicos de glutamato o GABA, (Greengard, 1976). Históricamente los receptores dopaminérgicos fueron clasificados en dos subtipos, a partir de su capacidad de estimular o inhibir la producción de AMPc. Se postularon entonces los receptores D1, ligados

positivamente a la activación de la adenilato ciclasa y los receptores D2, ligados a esta enzima de manera inhibitoria (Kebabian y Calne, 1979). Durante más de una década se utilizó esta clasificación para estudiar los mecanismos de acción de la dopamina.

A fines de la década del 80, las técnicas de biología molecular permitieron aislar cinco receptores dopaminérgicos diferentes. El D2R de la rata fue el primer receptor dopaminérgico clonado a partir de una biblioteca de ADNc de cerebro de rata (Bunzow *et al.*, 1988). Posteriormente se clonó el receptor ortólogo humano que mostró un 96 % de identidad (Grandy *et al.*, 1989). Le siguieron el receptor D1 de rata y humano (Zhou *et al.*, 1990), el receptor D3 humano y de rata (Giros *et al.*, 1990; Sokoloff *et al.*, 1990), el receptor D4 humano (Van Tol *et al.*, 1991) y el receptor D5 humano y de rata (Sunahara *et al.*, 1991; Tiberi *et al.*, 1991).

El descubrimiento de estos 5 subtipos de receptores dopaminérgicos hizo necesaria una nueva clasificación. Sin embargo, el análisis estructural, bioquímico y farmacológico demostró que todos los nuevos receptores dopaminérgicos pertenecían a una de las dos categorías inicialmente descritas según su acción sobre la adenilato ciclasa, por lo cual fueron divididos en los de "tipo D1" y los de "tipo D2" (Tabla 1). Los receptores "tipo D1" activan la adenilato ciclasa incrementando los niveles de AMPc intracelulares mientras que los receptores "tipo D2" ejercen un efecto inhibitorio sobre esta enzima (Andersen *et al.*, 1990; Onali *et al.*, 1992), aunque también están ligados a otras vías de transducción, como la activación de canales de K<sup>+</sup>, la inhibición de canales de Ca<sup>2+</sup> y la hidrólisis de fosfatidilinositol (Vallar y Meldolesi, 1989). La clasificación actual (Tabla 1) se basa en la estructura genómica, la secuencia aminoacídica, el acoplamiento a segundos mensajeros y el perfil farmacológico.

Los receptores "tipo D1" comprenden a los receptores D1 y D5, codificados en humanos por genes que carecen de intrones (Tabla 1). La identidad de secuencia entre ambos receptores resulta del 80 %, lo cual sugiere un origen evolutivo común, separados de los receptores de "tipo D2".

Los receptores "tipo D2" incluyen a los receptores D2, D3 y D4. Los tres genes comparten características comunes como la presencia de intrones y exones. El D2R posee dos variantes, D2 corto (D2S, D2 *Short*) y D2 largo (D2L, D2 *Long*), producidas por la inclusión

alternativa del sexto exón (Dal Toso *et al.*, 1989). Ambas variantes están presentes en humanos y en roedores (Montmayeur *et al.*, 1991). La identidad de secuencia entre los receptores D2 y D3 es del 75 %, en tanto que el receptor D4 posee solamente un 53 % de identidad con el D2R.

	Cantidad de aminoácidos		% de identidad de secuencia		Localización y organización cromosomal	Vías efectoras	Localización principal	Propiedades farmacológicas	
	Humano	Ratón	D1R	D2R				Agonistas	Antagonistas
Tipo D1									
D1	446	446	100	44	Cr. 5, sin intrones	Gs ↑ AMPc	Estriado, Núcleo accumbens, Tubérculo Olfatorio, Corteza, Amígdala	SKF 38393 R(+)-SKF 81297	SCH 23390 SKF 83566
D5	477	475	80	46	Cr. 4, sin intrones 2 pseudogenes	Gs ↑ AMPc	Hipocampo, Hipotálamo, Núcleo Parafascicular del Tálamo	Dihidrexedina	SCH 39166
Tipo D2								Quinpirol	Haloperidol Nemonapride
D2S/D2L	414/443	415/444	44	100	Cr. 11, 7 intrones	Gi/Go ↓ AMPc	Estriado, Núcleo accumbens, Tubérculo Olfatorio, SNpc/VTA, Pituitaria, Corteza	Cabergolina	Raclopride
D3	400	446	41	75	Cr. 3, 5 intrones	Gi/Go ↓ AMPc	Núcleo accumbens, Tubérculo Olfatorio, SNpc/VTA, Islas de Calleja	7-OH-DPAT	Raclopride
D4	387	385	41	53	Cr. 11, 3 intrones Gran cantidad de polimorfismos	Gi/Go ↓ AMPc	Corteza prefrontal, Retina, Estriado (?), Hipocampo (?)	CP 266-269 PD 168-067	Clozapina PNU 101-387 CP 293-019

**Tabla 1. Propiedades de los receptores dopaminérgicos.** Adaptado de Marsden (2006) y Alexander et al., (2009). Cr: cromosoma.

### 3.2. Localización

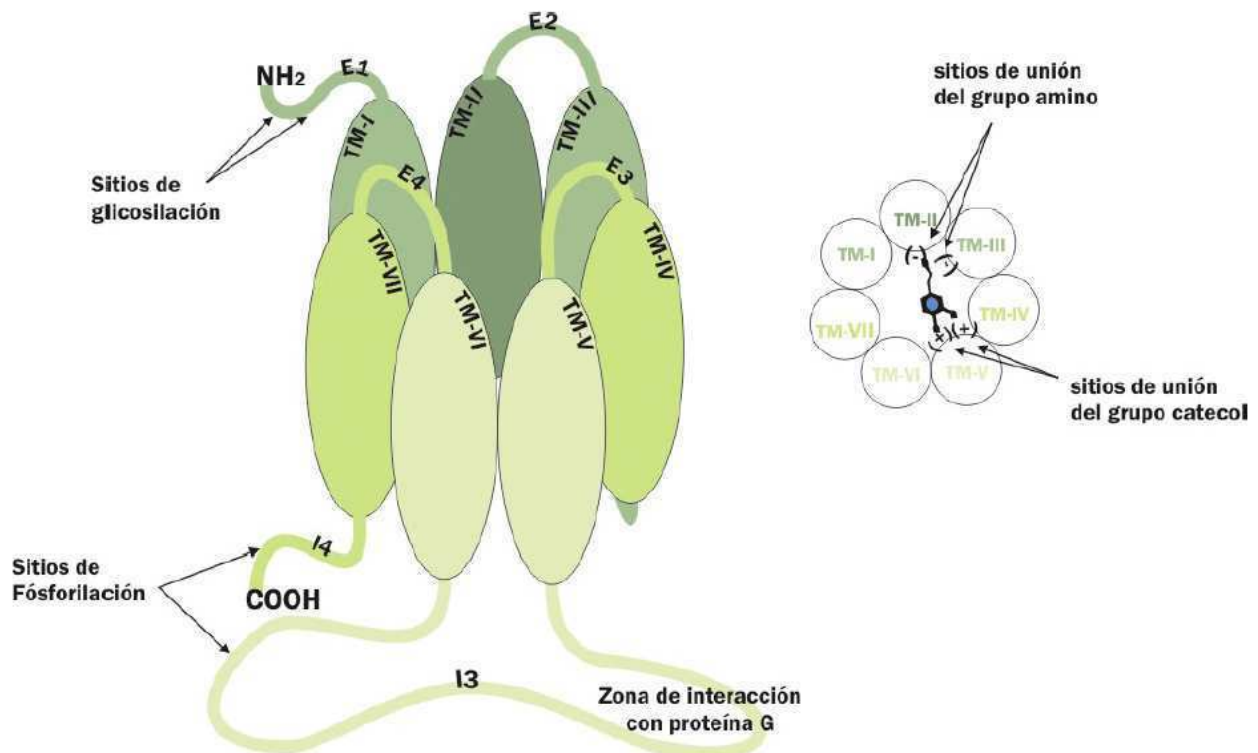
Los estudios de localización de los receptores dopaminérgicos en el cerebro se han abordado mediante diferentes técnicas experimentales como la utilización de ligandos selectivos marcados radioactivamente, el desarrollo de anticuerpos específicos o técnicas de biología molecular, como *Northern blot* e hibridación *in situ*. En algunos casos, el alto nivel de expresión de un determinado tipo de receptor y la disponibilidad de ligandos o anticuerpos altamente específicos permitió una descripción detallada y minuciosa de la localización de los receptores, como es el caso de los receptores D1 y D2. Sin embargo, para otros subtipos de receptores dopaminérgicos, como el receptor D4, el estudio de la distribución y el patrón de expresión ha sido más difícil, debido a la alta identidad con los otros receptores de la misma familia, y a los menores niveles de expresión que presenta.

Finalmente, el proyecto GENSAT ([www.gensat.org](http://www.gensat.org)) dirigido por el Dr. Heintz, permitió la caracterización más precisa del patrón de expresión de los receptores D1, D2 y D4 mediante la generación de animales transgénicos con BACs que expresan la proteína verde

fluorescente (EGFP) bajo las secuencias regulatorias del gen (Noaín *et al.*, 2006).

### 3.3. Estructura

Como se indicó anteriormente, todos los receptores dopaminérgicos clonados pertenecen a la superfamilia de receptores que interactúan con proteínas G. La secuencia aminoacídica de estos receptores predice siete dominios de paso transmembrana, con el grupo amino-terminal hacia el lado extracelular y el extremo carboxilo hacia el lado intracelular (Sibley *et al.*, 1992); (Figura 5). Las secuencias aminoacídicas de los receptores dopaminérgicos dentro de sus segmentos transmembrana mantienen un 31 % de identidad entre los 5 subtipos (Civelli *et al.*, 1993).



**Figura 5. Topología de los receptores dopaminérgicos.** Esquema de un receptor dopaminérgico. Izquierda: su estructura es de siete pasos transmembrana, cuyo extremo amino-terminal es extracitoplasmático mientras que el carboxi-terminal es intracitoplasmático. Posee sitios de glicosilación externos y de fosforilación internos que son utilizados para regular su actividad. En el tercer dominio intracitoplasmático se encuentra la zona de interacción con las proteínas G. Derecha: esquema de la vista superior donde se detallan los sitios transmembrana con los cuales interactúa la dopamina. **E:** sitios extracelulares, **I:** sitios intracelulares, **TM:** dominios transmembrana (enumerados en caracteres romanos).

El tercer dominio intra-citoplasmático es importante para el acoplamiento con los

segundos mensajeros ya que interactúa con proteínas G y es más largo en los receptores “tipo D2”, los cuales también presentan un extremo C-terminal más corto. Los cinco subtipos de receptores dopaminérgicos poseen secuencias consenso para sitios de glicosilación en el dominio N-terminal y sitios de fosforilación en el dominio carboxi-terminal (Figura 5) que regulan la actividad del receptor. También se indican las posiciones en los dominios transmembrana que son importantes para la unión de la dopamina.

### 3.4. Propiedades Farmacológicas

Debido a la alta homología de secuencia existente entre los receptores dopaminérgicos dentro de cada subclase, es frecuente que presenten propiedades farmacológicas similares, particularmente porque poseen gran similitud en los sitios involucrados en la unión del ligando. Los receptores de “tipo D1” presentan características distintivas como la alta afinidad por las benzacepinas (SCH 23390, SKF 38393), y la baja afinidad por las butirofenonas (espiperona, haloperidol) y las benzamidas sustituidas (raclopride, sulpiride y nemonapride). Una característica sobresaliente del receptor D5 es que posee 3 veces mayor afinidad por la dopamina que el receptor D1 (Missale *et al.*, 1998). Las propiedades principales de los receptores de “tipo D2” consisten en una alta afinidad por las butirofenonas, las fenotiazinas (clorpromazina) y las benzamidas, y una baja afinidad por las benzacepinas. 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 (Van Tol *et al.*, 1991).

A partir de estas características particulares de cada subfamilia, se han logrado diseñar ciertas drogas que presentan afinidades más altas por algún subtipo de receptor (Tabla 1), pero en la mayoría de los casos la selectividad no es absoluta. Por lo tanto, resulta muy difícil, desde la farmacología, establecer el aporte individual de cada receptor dopaminérgico en un comportamiento determinado. Debido a este inconveniente, cobran una especial relevancia los modelos experimentales de genética molecular, capaces de producir animales carentes de un receptor dopaminérgico en particular. Se han generado mutantes nulos de cada subtipo de receptor dopaminérgico descrito y estos ratones han sido estudiados a fondo para la identificación de la función que cada uno de ellos desempeña. Sin embargo, resultan cada vez más evidentes las limitaciones que estos mutantes presentan en este tipo de estudios, debido a los efectos compensatorios que



poseen como resultado de su ausencia desde las etapas más tempranas del desarrollo del animal. Esta dificultad propulsó el desarrollo de ratones mutantes condicionales que permiten activar mutaciones nulas luego del desarrollo y maduración neuronal de todos los circuitos cerebrales. La discusión de esta problemática se retomará más adelante.

#### **4. El circuito de los ganglios de la base**

A través de sus receptores, la dopamina ejerce una función regulatoria e integradora en la ejecución de comportamientos complejos tales como la actividad exploratoria y la inhibición conductual. Dentro del circuito de los ganglios de la base la señalización dopaminérgica interactúa con otros neurotransmisores para dar lugar al control fino de los movimientos. A continuación se describen brevemente cómo funciona este circuito y la manera en que la dopamina participa.

##### **4.1. Anatomía y fisiología**

En el cerebro de los mamíferos se encuentran los ganglios de la base que consisten en un grupo de núcleos subcorticales interconectados entre sí que están involucrados en funciones muy importantes de motivación, planeamiento motor y aprendizaje y coordinación de los movimientos, aunque también participan en la regulación de comportamientos emocionales y cognitivos. Los ganglios de la base están formados por el estriado, el globo pálido, la sustancia nigra (SN) y el núcleo subtalámico (NST). El estriado es un único núcleo en roedores, pero en vertebrados superiores se divide por la cápsula interna en los núcleos caudado y putamen (CPu). A su vez, el estriado se divide en dorsal y ventral, siendo este último conocido como núcleo accumbens (NAcc). El globo pálido consiste en dos regiones, el segmento externo (GPe) y el segmento interno (GPi); ambas divisiones tienen distintas aferencias y eferencias y distintas funciones. La SN también está compuesta por dos sub-núcleos, la *pars compacta* (SNpc) y la *pars reticulata* (SNpr); que están compuestas por tipos de neuronas diferentes y tienen distintas aferencias (Tepper *et al.*, 2007).

Los núcleos de los ganglios basales se conectan entre sí formando un circuito complejo que recibe entradas desde la corteza para finalmente proyectar nuevamente información hacia otras áreas corticales (Figura 6) (Albin *et al.*, 1989). Los núcleos de entrada de los

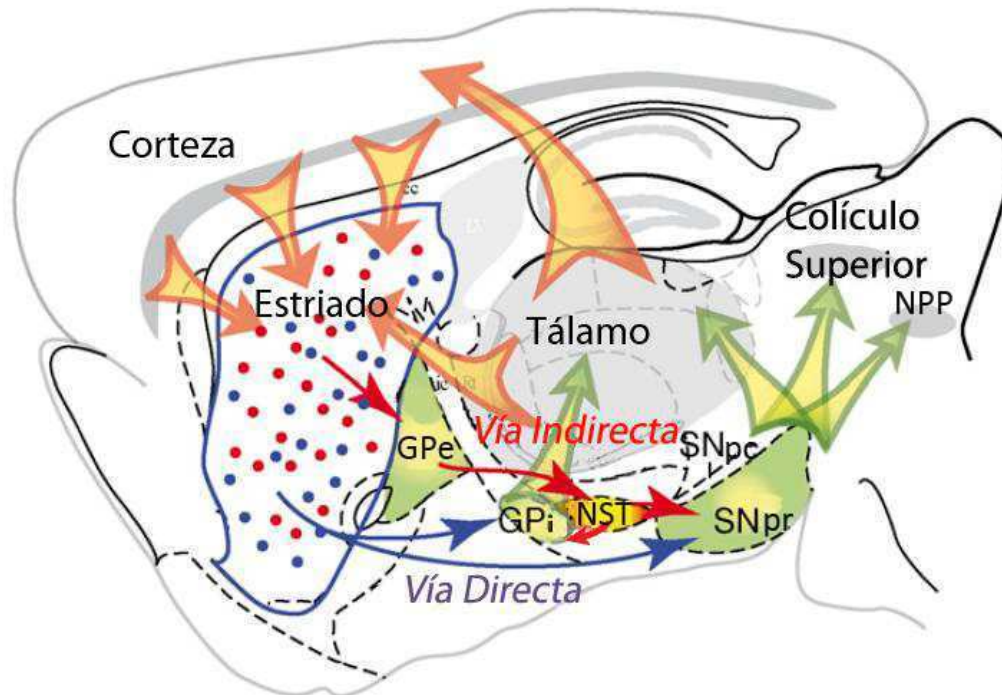
ganglios de la base son el estriado y el NST y reciben aferencias de toda la corteza cerebral (incluyendo la corteza motora, sensorial, de asociación y límbica), del tálamo y del sistema límbico (principalmente la amígdala y el hipocampo). Estas conexiones están intermitentemente activas y utilizan el glutamato como neurotransmisor (Redgrave *et al.*, 1999), ejerciendo un efecto excitatorio sobre las neuronas estriatales (Calabresi *et al.* 1996). Otra aferencia estriatal de gran relevancia está constituida por las fibras dopaminérgicas provenientes de la SNpc, que modulan la información que llega desde la corteza (Smith y Bolam, 1990). El estriado también recibe la acción moduladora de las aferencias serotoninérgicas provenientes del rafe dorsal y noradrenérgicas del *locus coeruleus* (Gerfen, 1996).

Los núcleos de salida de los ganglios de la base son la SNpr y el núcleo entopenduncular (GPi en primates). Estas estructuras están constituidas por neuronas GABAérgicas inhibitorias, tónicamente activas, que proyectan sobre el tálamo (éste luego vuelve a proyectar hacia la corteza) y hacia áreas premotoras del tallo cerebral que incluyen el colículo superior, el colículo inferior, la sustancia gris periacueductal, el núcleo pedunculopontino y cuneiforme y diversas áreas de la formación medular y mesencefálica (Redgrave *et al.*, 1999).

El 95 % de las neuronas presentes en el estriado pertenecen a la categoría de neuronas espinosas medianas estríofugales (NEMs). Son neuronas GABAérgicas, que proyectan sus axones fuera del estriado y se caracterizan por poseer numerosas espinas dendríticas sobre las cuales hacen sinapsis las aferencias corticales glutamatérgicas y las terminales dopaminérgicas. El 5 % restante corresponde a interneuronas, principalmente GABAérgicas y colinérgicas (Kawaguchi *et al.*, 1997).

Las conexiones entre los ganglios basales están organizadas de manera tal que los impulsos fásicos puedan disminuir o aumentar el efecto inhibitorio tónico de los núcleos de salida sobre sus estructuras blanco. Para ello, existen dos circuitos internos. La vía directa, donde las NEMs del estriado expresan principalmente receptores dopaminérgicos D1 y proyectan directamente sobre los núcleos de salida (SNpr/GPi) disminuyendo la inhibición tónica sobre el tálamo. Y la vía indirecta, donde las NEMs del estriado expresan principalmente receptores dopaminérgicos D2 y proyectan sus axones hacia el GPe, que inhibe tónicamente al NST. El NST estimula a los núcleos de salida, que terminarán

aumentando su inhibición sobre el tálamo.

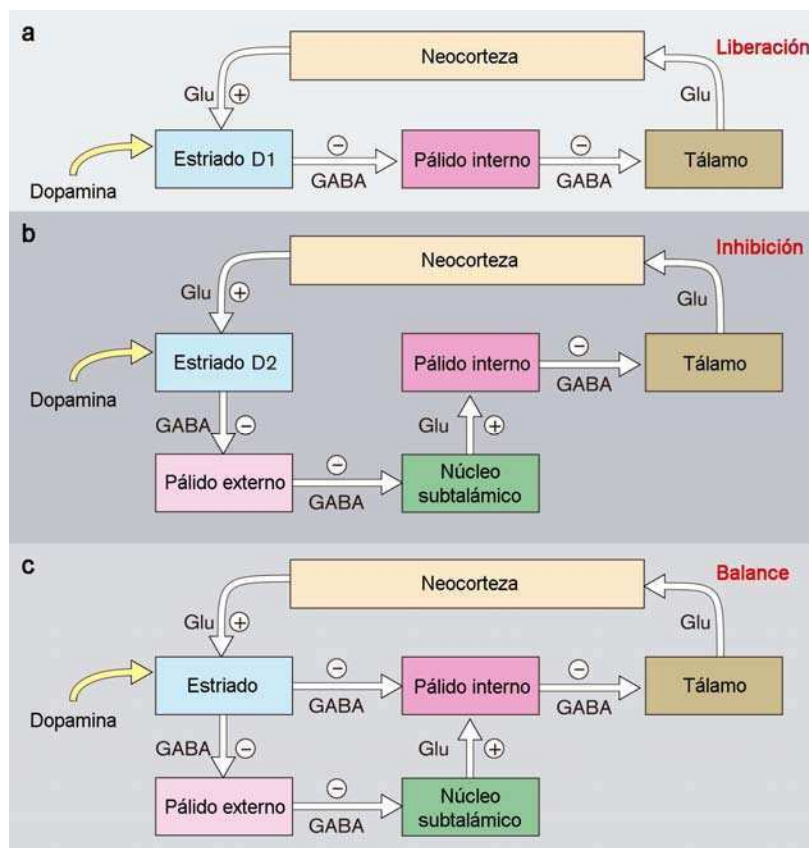


**Figura 6. El circuito de los ganglios de la base.** El estriado recibe proyecciones corticales y talámicas excitatorias (flechas naranjas). Los núcleos de salida de los ganglios basales están constituidos por el segmento interno del globo pálido (GPi) y la sustancia nigra *pars reticulata* (SNpr) que proyectan hacia el tálamo, el colículo superior y el núcleo pedunculopontino (NPP). La vía directa (flechas azules) que se origina en las neuronas espinosas medianas estriofugales (NEMs) del estriado que expresan receptores D1, proyecta a los núcleos de salida GPi y SNpr. La vía indirecta (flechas rojas) se origina en las NEMs estriatales que expresan receptores D2 que envían sus axones a neuronas del segmento externo del globo pálido que luego proyectan sobre el núcleo subtalámico (NST) y éste a los núcleos de salida. Adaptado de Gerfen et al. (2011).

El modelo más aceptado para explicar desórdenes motores como las enfermedades de Parkinson y de Huntington, es que los ganglios basales tienen dos vías diferentes, que compiten entre sí funcionalmente para liberar el movimiento (la vía directa), o para inhibir el movimiento (la vía indirecta) (Figura 7a y b). Dichas vías compiten actuando como el freno y el acelerador en un automóvil (Graybiel, 2000). El modelo de freno-acelerador sugiere que la liberación (desinhibición) del tálamo por la vía directa se opone por la vía indirecta, que inhibe el tálamo a través de proyección excitatoria adicional desde el NST al GPi (Figura 7; Graybiel, 2000).

Según el modelo clásico de los ganglios de la base, la dopamina, al liberarse en el estriado, actúa sobre ambos tipos de receptores (D1R excitatorios sobre la vía directa y D2R

inhibitorios sobre la vía indirecta) y en ambos casos estaría favoreciendo el movimiento (Figura 7c) (Albin *et al.*, 1989; Graybiel, 2000). Este modelo establece entonces, que la inervación dopaminérgica sobre el estriado conduce a un mismo resultado por ambos circuitos: la liberación del tono inhibitorio sobre el tálamo y la consecuente liberación de glutamato en la vía tálamo-cortical.



**Figura 7. El modelo de freno-acelerador para trastornos motores de los ganglios de la base.**

**a.** La vía directa (que conduce a la liberación de movimiento) consta de dos conexiones sucesivas GABAérgicas, desde el estriado al pálido interno (GPi) y desde el GPi al tálamo. Este diagrama de flujo sugiere que las proyecciones excitatorias (glutamato, Glu) de la neocórtex en el estriado desinhibirían las neuronas talámicas. La dopamina modula el sistema principalmente en el estriado donde se activan receptores dopaminérgicos de tipo D1 y D2. **b.** En la vía indirecta (que conduce a la inhibición del movimiento), hay un paso adicional después del pálido externo (GPe), de modo que el núcleo subtalámico excita al GPi. **(c)** El equilibrio se logra cuando estos sistemas antagónicos se combinan en circunstancias normales. Adaptada de Graybiel (2000).

## 4.2. Funciones de los ganglios de la base

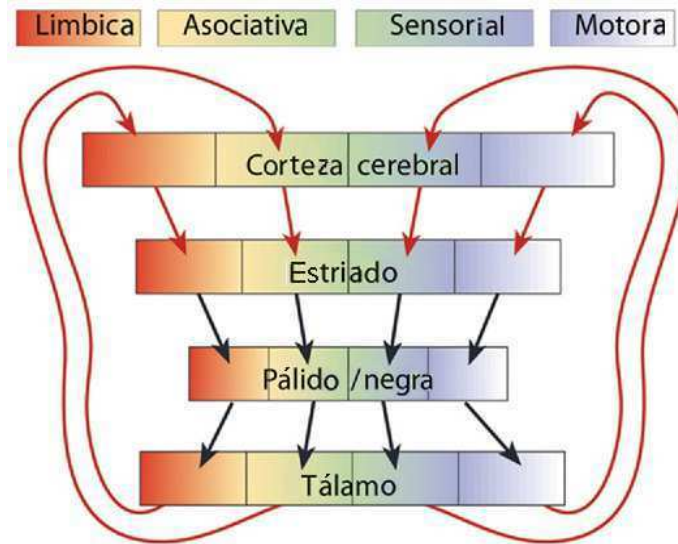
Los ganglios basales se han vinculado con numerosas y diversas funciones como la percepción, el aprendizaje, la memoria, la atención, muchos aspectos de la actividad

motora (Redgrave *et al.*, 1999). Se han publicado numerosas interpretaciones sobre el rol principal que cumplen, pero la concepción general más aceptada es que permiten el control óptimo de las acciones (Graybiel, 2005). Representan un circuito extrapiramidal capaz de filtrar o seleccionar acciones o programas motores a expensas de otros posibles, en particular, aquellas acciones que lleven a la obtención de recompensas.

A los circuitos directo e indirecto se les atribuyen las funciones antagónicas de liberar o inhibir los movimientos, respectivamente (Graybiel, 2005). Sin embargo, la presencia de proyecciones colaterales de axones provenientes del estriado a todos los sitios de salida de los ganglios de la base que se extienden hacia componentes de ambos circuitos, sugiere que la regulación del movimiento es más compleja de lo que se creía inicialmente (Levesque y Parent, 2005).

Clásicamente, los ganglios basales se han vinculado a los mecanismos de aprendizaje. Se ha visto que durante la primera etapa del aprendizaje el comportamiento del individuo es variable, y con la sucesiva obtención de refuerzos las acciones son optimizadas. Así, pueden definirse etapas de "exploración" y, cuando la tarea ha sido adquirida, de "explotación" (Graybiel, 2005). La actividad registrada en proyecciones estriatales de rata parecería confirmar el rol de los ganglios basales en el aprendizaje de tareas, ya que ésta aumenta durante etapas de adquisición y extinción, pero se mantiene estable en etapas de sobre-entrenamiento y readquisición (Barnes *et al.*, 2005).

Existe cada vez más consenso en que los ganglios basales pueden subdividirse regionalmente en territorios segregados funcionalmente (esqueleto/óculo-motor, asociativo y límbico) dependiendo de la organización topográfica de los patrones de conectividad entre ellos y con las regiones corticales y talámicas que presentan las mismas divisiones funcionales (Alexander y Cruthcher, 1990). Por lo tanto, puntos de vista actuales sobre el procesamiento de la información dentro de los ganglios basales están muy influenciados por la posible existencia de estos múltiples canales paralelos (Figura 8). Estos canales se originan en la corteza cerebral y proyectan, a través de vías segregadas topográficamente, a los núcleos de los ganglios basales, y retornan a través de un relevo talámico hacia la corteza donde se originaron las proyecciones específicas córtico-estriatales (Alexander *et al.*, 1986).



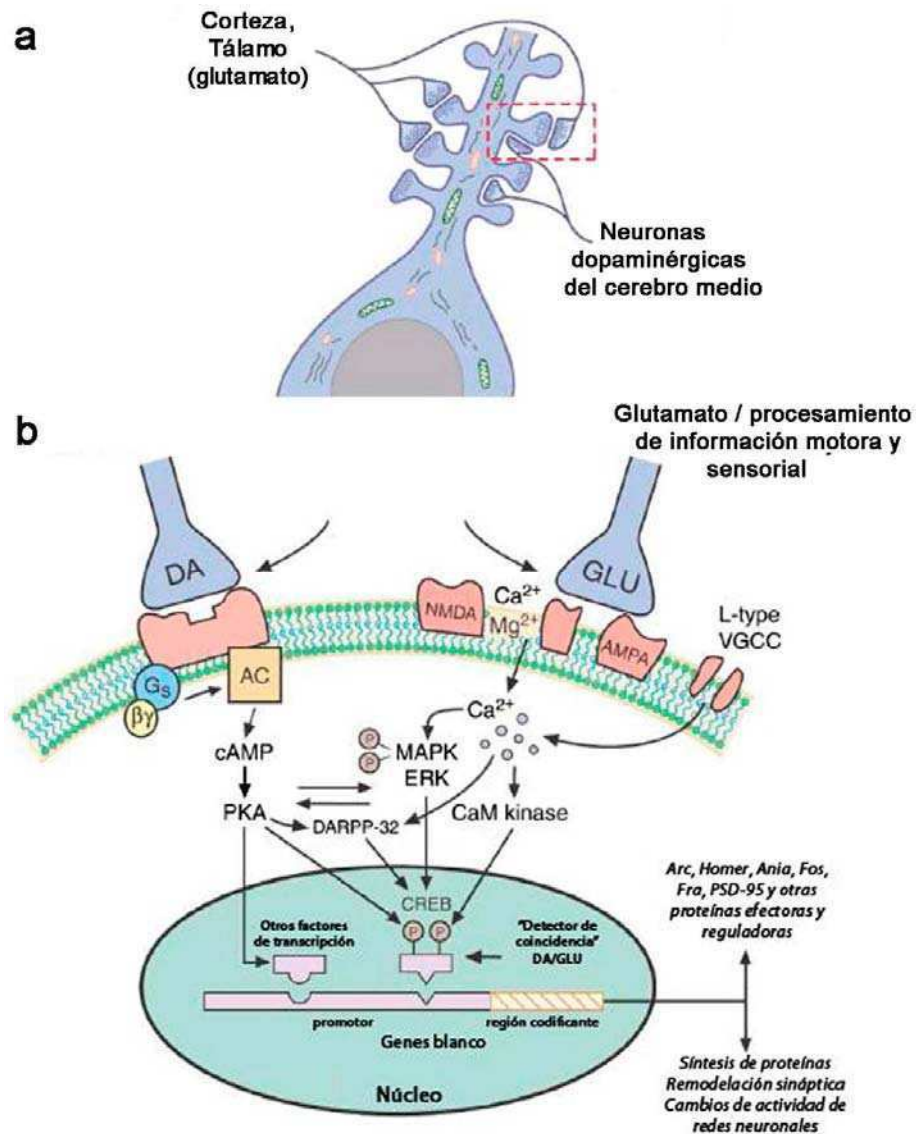
**Figura 8. Circuitos en bucle entre la corteza -ganglios basales-corteza en animales y humanos.** Un componente importante de las conexiones entre la corteza cerebral y los ganglios basales puede ser visto como una serie de bucles paralelos segregados o canales. (Alexander *et al.*, 1986). Territorios funcionales representados a nivel de la corteza cerebral se mantienen a lo largo de los núcleos de los ganglios basales y los puntos de relevo talámicos. Para cada ciclo, los puntos de relevo en corteza, ganglios basales y tálamo, ofrecen la oportunidad de ser modulados por señales provenientes fuera del circuito (Binns y Salt, 1995). Adaptada de Redgrave *et al.* (2011).

De esta manera, las células con especificidades sensoriales o motoras asociados con una musculatura específica (por ejemplo, miembros traseros, extremidad anterior, oral o oculomotora) se encuentran en regiones localizadas del estriado (Brown *et al.*, 1995, 1998; Flaherty *et al.*, 1991). La inactivación selectiva o daño a estas áreas produce alteraciones en tareas que implican el uso de esa parte del cuerpo en particular (Pisa, 1988). Por ejemplo, en el caso de las vías aferentes al estriado, las regiones ventromediales reciben señales de las estructuras cerebrales principalmente relacionadas con la emoción y la motivación; las regiones dorsomediales de las involucradas con la cognición, y las dorsolaterales de las implicadas en el control sensorio-motor (Alexander *et al.*, 1986, Redgrave *et al.*, 2011) (Figura 8). Sin embargo, algunos trabajos sostienen que este sistema de proyecciones en bucle no es cerrado y por lo tanto no vuelven al mismo lugar del que partieron sino que es un sistema abierto y algunas proyecciones retornan a sitios distintos de donde se originaron dentro de la corteza (Joel *et al.*, 1994).

### 4.3. El papel modulador de la dopamina en el estriado

El papel esencial que cumple la dopamina nigroestriatal en la regulación del movimiento quedó claramente evidenciado a partir de la observación de que en la enfermedad de Parkinson las alteraciones motoras se deben a la pérdida de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales (Hornykiewicz, 1966) y que la administración de L-DOPA revierte los signos clínicos de la enfermedad (Cotzias *et al.*, 1967). Posteriormente se desarrollaron los primeros modelos animales de parkinsonismo lesionando las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales (Ungerstedt y Arbuthnott, 1970).

Las modificaciones en las sinapsis son mecanismos fundamentales para alterar la función de los circuitos neuronales. En el estriado, el disparo de las NEMs en las vías directa e indirecta está influenciado por proyecciones excitatorias e inhibitorias rápidas así como por modulaciones más lentas mediadas por dopamina y otras moléculas (Wang *et al.*, 2006; Kreitzer y Malenka, 2008 González *et al.*, 2011). Mientras que la inervación aferente glutamatérgica proviene de regiones extra-estriatales, las inervaciones inhibitorias son intra-estriatales (Gustafson *et al.*, 2006; Tepper *et al.*, 2004). Cada NEM recibe contactos sinápticos de más de 1.000 neuronas corticales excitatorias, cuyos axones terminan en la cabeza de las espinas dendríticas (Gerfen, 1996). Cuando el glutamato es liberado produce potenciales excitatorios postsinápticos (PEPS) mediados por receptores del tipo AMPA/kainato y en menor medida NMDA (Kawaguchi, 1997) (Figura 9b). Si varios de estos PEPS ocurren en sectores adyacentes a una dendrita se producirá su sumatoria espacial y eventualmente ocurrirá una descarga de potenciales de acción. Las sinapsis dopaminérgicas nigroestriatales se localizan sobre el cuello de las espinas dendríticas de las NEMs (Figura 9a) modulando las sinapsis entre las aferencias corticales y las NEMs (Figura 9a).



### Figura 9. Contactos sinápticos sobre las neuronas espinosas medianas estríofugales (NEMs).

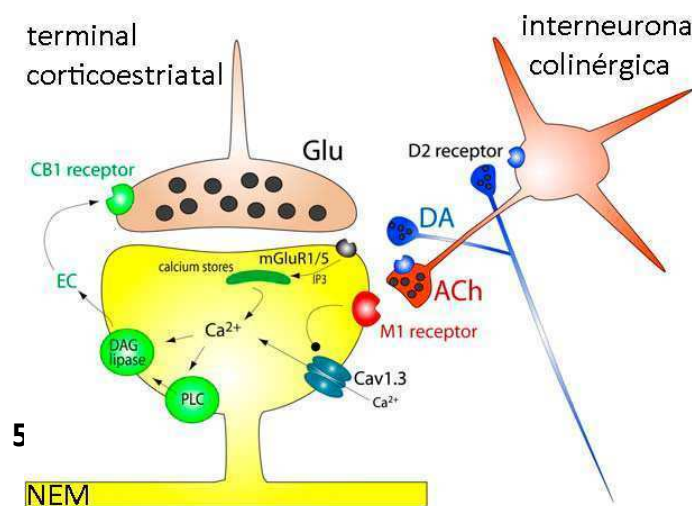
**a.** Las fibras corticales descendentes (glutamatergicas) hacen sinapsis en la cabeza de las espinas dendríticas distales. Las aferencias dopaminérgicas nigroestriatales terminan en el cuello de las espinas dendríticas (Smith y Bolam, 1990). **b.** Se detalla la zona recuadrada en **a**. Se muestra el efecto de la convergencia de dopamina (DA) y glutamato (GLU) sobre la inducción de factores regulatorios que llevan a la remodelación sináptica y a cambios a largo plazo de la plasticidad celular. Se muestra a su vez, el efecto que producirían las drogas de abuso (Berke y Hyman, 2000).

Evidencias experimentales más recientes postulan que la dopamina podría ejercer una modulación indirecta sobre la actividad de las NEMs disminuyendo la liberación de glutamato de los terminales córticoestriatales (Wang *et al.*, 2006; Kreitzer y Malenka, 2008; Cepeda *et al.* 2001) a través de diversos mecanismos, por (i) receptores dopaminérgicos de "tipo" D2 presentes en los terminales glutamatérgicos que proyectan sobre el estriado



(Bamford *et al.* 2004; Hsu *et al.*, 1995; González *et al.*, 2011) y/o por (ii) receptores "tipo D2" presentes en interneuronas estriatales colinérgicas (Wang *et al.*, 2006).

Se cree que en las alteraciones en la fuerza sináptica de las conexiones entre la corteza y el estriado subyacen los cambios adaptativos en el comportamiento. La plasticidad mejor caracterizada en estas sinapsis es la depresión a largo plazo (LTD) (Centonze *et al.*, 2001; Malenka y Bear, 2004; Nicola *et al.*, 2000). La inducción del LTD corticostriatal es dependiente de dopamina, liberada en respuesta a una recompensa o a estímulos asociados a una recompensa (Schultz, 2005). Las interneuronas colinérgicas estriatales gigantes expresan altos niveles de D2R cuya activación disminuye la actividad espontánea y reduce la liberación de acetilcolina (ACh) (DeBoer *et al.*, 1996; Maurice *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 1997). A su vez, la ACh modula fuertemente ambos tipos de NEMs (Dodt y Misgeld, 1986; Galarraga *et al.*, 1999; Howe y Surmeier, 1995), especialmente a través de los receptores muscarinic M1 ubicados estratégicamente en las sinapsis corticostriatales (Bernard *et al.*, 1992; Hersch *et al.*, 1994; Yan *et al.*, 2001). Una de las acciones principales del receptor M1 es reducir la apertura canales de  $Ca^{2+}$  de tipo L ubicados en postsinapsis glutamatérgicas (Day *et al.*, 2006; Olson *et al.*, 2005) y necesarios para la inducción del LTD (Calabresi *et al.*, 1994; Choi y Lovinger, 1997; Kreitzer y Malenka, 2005). La acción inhibitoria de la dopamina sobre la actividad del receptor M1 llevará a una aumento en las corrientes de  $Ca^{2+}$  en respuesta a una despolarización. El aumento de  $Ca^{2+}$  resultará en una producción aumentada de endocannabinoides (EC) y la activación presináptica de receptores CB-1 que reducen la liberación de glutamato (Figura 10).



**Figura 10. Modelo de los elementos celulares y moleculares que controlan la inducción del LTD en neuronas espinosas medias (NEMs).** Se cree que la dopamina actúa principalmente a través de receptores D2 en interneuronas colinérgicas, disminuyendo la liberación de acetilcolina (ACh). Adaptado de Wang *et al.* (2006).

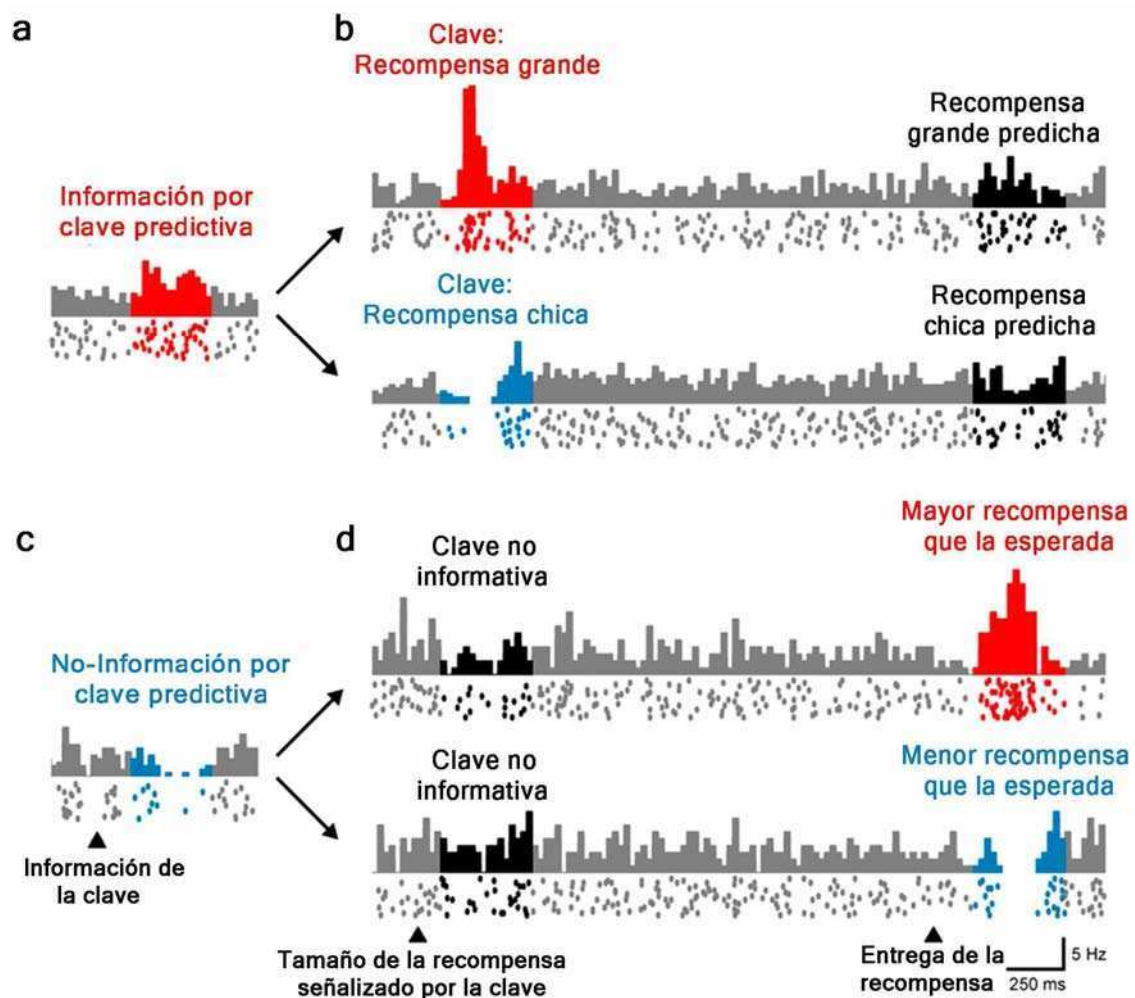
## 5.1. Dopamina y el circuito de la recompensa

El término recompensa suele asociarse a felicidad y gratificación, pero la investigación del comportamiento animal sugiere que el término recompensa debe utilizarse en un sentido más amplio, como cualquier objeto o evento que genera una conducta de aproximación y consumo produciendo el aprendizaje de ese comportamiento. La señalización de recompensas es de vital importancia para la supervivencia ya que de ellas dependen procesos tan elementales como beber, comer y reproducirse. Disfunciones en los mecanismos de recompensa están asociadas con obesidad y adicción a drogas. Las recompensas responden a múltiples estímulos sensoriales; el cerebro extrae la información a partir de estímulos visuales, auditivos, y olfatorios, entre otros. De esta manera, una recompensa no está definida por la química y la física de un estímulo, sino por las reacciones que inducen en el comportamiento de un animal (Schultz, 2007).

La dopamina es liberada frente a experiencias naturalmente gratificantes como la comida, el sexo y estímulos neutrales asociados a ellas. La acción de la dopamina y el glutamato sobre las NEMs, lleva a la activación de mecanismos intracelulares de transducción de señales que inducen cambios a largo plazo en la plasticidad celular, reconfigurando las redes neuronales y la conducta (Figura 9B) (Berke y Hyman, 2000). En situaciones normales, el cerebro utiliza estos mecanismos para optimizar las respuestas hacia las recompensas, que llevarán a asegurar la supervivencia.

La visión sobre el rol de la dopamina en la señalización y aprendizaje de recompensas de Wolfram Schultz está basada en experimentos realizados con monos en los que se observó la respuesta de las neuronas dopaminérgicas frente a la obtención de recompensas. Se determinó que estas neuronas no responden al consumo de una recompensa *per se*, sino que señalizan "errores en la predicción de recompensas" (*reward prediction error*, en inglés), es decir, que reportan la diferencia entre la recompensa que el animal recibe y la recompensa que esperaba recibir (Figura 11; Schultz *et al.*, 1997). Entonces, si una recompensa es mayor a la esperada, las neuronas dopaminérgicas son fuertemente excitadas (error positivo de predicción); si la recompensa es menor a la esperada o no se recibe, las neuronas dopaminérgicas son inhibidas (error negativo de predicción); y si la recompensa es de igual magnitud a la esperada, las neuronas dopaminérgicas no responden. Además, si un estímulo se asocia con la obtención de una recompensa, el

mismo patrón de respuesta de las neuronas dopaminérgicas ocurre ahora frente a la llegada de este estímulo. Este constituye un tipo especial de error en la predicción de recompensas llamado "error en la diferencia temporal" y se postula que actúa como una señal reforzadora para el aprendizaje del valor de las acciones y estados ambientales (Houk y Wise, 1995; Montague *et al.*, 1996; Schultz, 2007).



**Figura 11. La dopamine codifica errors de predicción y la preferencia por información predictiva.** Las neuronas de dopamine codifican una señal de errors de predicción que responden a excitaciones fásicas cuando una recompensa tiene un valor mayor al anticipado por una clave informativa o estímulo (rojo) y una inhibición fásica cuando la recompensa es menor a la anticipada o predicha (azul). Las neuronas dopaminérgicas pueden responder a la clave informativa (**a-b**) o al valor de la recompensa en ausencia de claves predictivas (**c-d**). Adaptado de Bromberg-Martin *et al.* (2010).

## 5.2. Dopamina y motivación

La dopamina mesolímbica fue considerada durante mucho tiempo como un neurotransmisor del placer, pero cada vez más neurocientíficos (Berridge y Kringelbach, 2008) consideran que esto es erróneo basándose en que las neuronas dopaminérgicas no siempre son activadas por el valor hedónico de una recompensa, sino que pueden responder a características predictivas, motivacionales y atencionales de un estímulo y ante experiencias sorprendidas, novedosas, salientes, e incluso aversivas (Carelli, 2004; Cheer *et al.*, 2007; Redgrave y Gurney, 2006; Salamone *et al.*, 2007; Schultz *et al.*, 1997; Lisman y Grace, 2005).

Existen distintos tipos de neuronas dopaminérgicas que difieren según la naturaleza de estímulos a los que responden (Bromberg-Martin *et al.*, 2010): i) un tipo codifica el "valor" de un evento (*motivational value*), si es positivo o negativo, ya que es excitada por eventos gratificantes e inhibida por eventos aversivos; ii) un segundo tipo codifica la "saliencia" de un evento (*motivational salience*), si es relevante, ya que es excitado tanto por eventos gratificantes como aversivos, mientras que no responden a estímulos neutros. Además, ambos tipos de neuronas también transmiten una señal de alerta, activada por señales sensoriales inesperadas potencialmente de alta importancia. En conjunto, estas señales de valor, saliencia y alerta cooperan para coordinar las respuestas a ejecutar y controlar la conducta motivada (Bromberg-Martin *et al.*, 2010).

La transmisión dopaminérgica es crucial para generar un estado de motivación suficiente para ir a buscar recompensas (Berridge y Robinson, 1998; Salamone *et al.*, 2007) y, también, para establecer memorias de estímulos asociados a esas recompensas (Dalley *et al.*, 2005). La liberación de dopamina no es necesaria para todas las formas de aprendizaje asociado a recompensas y, como se mencionó previamente, no siempre responde al "placer" (*liking*) que provoca una recompensa, pero sí es fundamental para hacer que un objetivo determinado sea "deseado" (*wanting*) (Berridge y Robinson, 1998; Palmiter, 2008) y entonces producir una posterior conducta de aproximación.

Se ha demostrado que la dopamina juega un rol importante en la modulación de la tendencia a trabajar por una recompensa en una serie de paradigmas (Salamone *et al.*, 2005). Tanto los niveles de dopamina fásicos como tónicos han sido implicados en comportamientos dirigidos a la comida. En experimentos de conducta operante, en los que

los animales deben presionar una palanca a cambio de comida, se observó que, frente a la falta de dopamina en el núcleo accumbens o frente a una lesión del núcleo, se produce una disminución marcada en la carga de trabajo que los animales están dispuestos a realizar para la obtención de alimento cuando las tasas de refuerzo son altas (tasas fijas de 16 o 32 con tasas progresivas de 3), mientras que esto no afecta cuando la carga es mínima (tasa fija de 1; McCullough *et al.*, 1993; Salamone *et al.*, 1995; Aberman y Salamone, 1999; Ishiwari *et al.*, 2004). Contrariamente, se vio que la administración local de anfetamina en el núcleo accumbens aumenta la motivación por la comida en un esquema operante de tasa progresiva (Di Ciano *et al.*, 2001). Estudios realizados con ratones con sólo el 10 % de DAT (DAT *knockdown*), mostraron alcanzar un aumento del 170 % en los niveles de dopamina extracelular, y se observó que estos animales presentan mayores niveles de motivación por soluciones dulces (de sacarosa) sin que necesariamente se vea afectado el placer que le produce la misma (medido por las expresiones orofaciales de los animales en respuesta a la sacarosa) (Berridge *et al.*, 2010).

### **5.3. Dopamina y adicción**

La drogadicción es un desorden caracterizado por la búsqueda y el consumo compulsivo de sustancias que afectan negativamente la salud y las bases de las relaciones sociales y laborales del adicto (Koob, 2009; Deroche-Gamonet *et al.*, 2004; Vanderschuren y Everitt, 2004; Everitt y Robbins 2005). La adicción es una patología de la señalización de recompensas en el cerebro, la motivación, la memoria y circuitos relacionados. En la adicción se alteran los mecanismos que el cerebro utiliza para determinar la relevancia y jerarquía de comportamientos que aseguran la supervivencia. Se inicia con el consumo de sustancias (drogas) o con conductas (apostar, por ejemplo) que activan de manera directa e intensa los circuitos de la recompensa. Los cambios inducidos por la exposición a drogas a largo plazo conducen a una alteración en la adaptación al medio ambiente que normalmente permite conseguir recompensas naturales como la comida o el sexo, o evitar situaciones peligrosas (Kelley, 2004; Everitt y Robbins, 2005); y que se manifiesta en dos puntos cardinales de la adicción, (i) la imposibilidad de controlar el deseo por la obtención y toma de drogas (la recaída), y (ii) la disminución en el deseo de obtener recompensas naturales (Kalivas y O'Brien, 2008).

La mayoría de las personas que utilizan drogas no suelen alcanzar niveles incontrolables de

consumo, pero en algunas (cerca del 16 % de aquellas que prueban la cocaína) la experiencia produce asociaciones condicionadas fuertes a estímulos ambientales que señalizan la disponibilidad de la droga o conducta (Anthony *et al.*, 1994). Quién se convierte en adicto está fuertemente influenciado por factores genéticos (50 % de riesgo), de desarrollo (el riesgo es mayor en la adolescencia que en la edad adulta), ambientales (acceso a los medicamentos, estrés), así como el tipo de drogas (algunas producen adicción más rápidamente que otras) (Volkow *et al.*, 2012).

Las diversas sustancias varían en su capacidad para producir sensaciones agradables inmediatas en el consumidor. La sensación de euforia que producen las drogas de abuso es la razón principal por la que los seres humanos las utilizan y los animales de laboratorio se las autoadministran (Wise, 2009). Esta sensación placentera despierta en el consumidor el deseo de obtenerlas otra vez *reforzando* así las acciones de búsqueda y consumo. Cuanto más potente sea el refuerzo que produce una sustancia, tanto mayor será la probabilidad de que se abuse de ella (O'Brien, 2011).

Las propiedades reforzantes de las drogas se vinculan con su capacidad de incrementar los niveles de dopamina, especialmente en el núcleo accumbens (NAcc) (Di Chiara e Imperato, 1988). Se han realizado estudios clínicos utilizando la tomografía por emisión de positrones (PET) que se basan en la medición de los receptores dopaminérgicos D2 que no están ocupados por la dopamina (receptores libres) y, por lo tanto, están disponibles para unirse a los radiotrazadores utilizados en el PET ( $[^{11}\text{C}]$ -racloprida,  $[^{18}\text{F}]$ -fallypride, o  $[^{11}\text{C}]$ -PHNO) y estiman cambios relativos en la concentración de dopamina en la sinapsis *in vivo* después del placebo o de la exposición aguda a drogas (Breier *et al.*, 1997). La mayoría de las drogas de abuso evaluadas en humanos inducen un aumento significativo de la dopamina en el estriado ventral (donde se localiza el NAcc); efecto que se asoció con la percepción subjetiva de las mismas como reforzantes (Volkow *et al.*, 2009) (drogas estimulantes (Volkow *et al.*, 1999; Drevets *et al.*, 2001), nicotina (Brody *et al.*, 2009), alcohol (Boileau *et al.*, 2003; Ramchandani *et al.*, 2010) y la marihuana (Bossong *et al.*, 2009)).

Además, los estudios de PET han demostrado que los perfiles farmacocinéticos de las drogas son cruciales para sus efectos reforzantes. Particularmente, la velocidad en que las drogas llegan al cerebro se asocia a sus efectos de recompensa. Estos estudios han demostrado que, después de la administración intravenosa, la nicotina alcanza niveles

máximos en 2-3 minutos, la cocaína en 4-6 minutos, y la metanfetamina en 10-15 min (Volkow *et al.*, 1995; Fowler *et al.*, 2008). Las distintas rutas de administración de una droga (oral, endovenosa, fumada, inyectada) influyen la velocidad a la cual las drogas llegan al cerebro afectando los efectos de recompensa. Por ejemplo, cuando la cocaína entra en el cerebro rápidamente (fumada o intravenosa) genera una sensación más intensa que cuando entra en el cerebro más lentamente (aspiración), aún cuando las dosis administradas a los participantes se ajusten para alcanzar niveles de bloqueo del transportador de dopamina similares en el cerebro (Volkow *et al.*, 2000).

Muchas drogas, como la cocaína y la anfetamina, actúan alterando el funcionamiento del DAT que normalmente recapta la dopamina del espacio sináptico. Cuando la actividad del DAT es bloqueada por uno de estos compuestos, la cantidad de dopamina acumulada en la sinapsis aumenta, generando un aumento en la señalización dopaminérgica. Cuando esto ocurre, particularmente en el NAcc, el aumento de la acción de la dopamina sobre los receptores D1 y D2, es capaz de mediar los estímulos reforzantes que producen la toma de drogas (Carr y White, 1983).

El condicionamiento es una de las neuroadaptaciones iniciales que siguen a la exposición a las drogas e involucra liberaciones fásicas de dopamina (especialmente por activación de D1R) y cambios sinápticos en los receptores NMDA y AMPA (Zweifel *et al.*, 2009; Kauer y Malenka, 2007). Se cree que estas respuestas condicionadas subyacen al intenso deseo por consumir la droga que se produce cuando los sujetos adictos se exponen a estímulos relacionados con las mismas, lo que provoca el desarrollo de conductas compulsivas.

Los estudios por imágenes revelaron que en adictos hay una disminución en la repuesta a refuerzos biológicos (Kalivas y O'Brien, 2008; Garavan *et al.*, 2000). Además, sujetos adictos a drogas como cocaína, heroína, alcohol, cannabinoides, nicotina y metanfetamina, mostraron una reducción en los niveles D2R disponibles en el estriado que persiste incluso meses después de la desintoxicación (Volkow *et al.*, 2009); mientras que no se reportan cambios en los niveles de D1R (Martinez *et al.*, 2009). Menores niveles de D2R disminuyen la señalización de la neurotransmisión dopaminérgica y se correlaciona con la reducción en las sensaciones de placer generado por el metilfenidato reportadas por individuos adictos con respecto a sujetos control (Kalivas y O'Brien, 2008). En sujetos no adictos, los efectos del metilfenidato son más placenteros cuanto menor es la densidad de D2R estriatales

(Volkow *et al.*, 2012).

Esta reducción se asoció con disminuciones en la actividad de varias regiones prefrontales incluyendo i) la corteza orbitofrontal (COF) que participa en la atribución de relevancia y conductas dirigidas a objetivos; ii) la corteza cingulada anterior (CCA) que participa del control inhibitorio y la conciencia; y iii) la corteza prefrontal dorsolateral que participa en las operaciones cognitivas más altas y la toma de decisiones (Volkow *et al.*, 1993, 2001, 2007). Como deficiencias en la COF y la CCA se han asociado a conductas compulsivas e impulsivas, se postuló que la falta de regulación mediada por dopamina en estas regiones podría ser la causa que subyace a la toma compulsiva e impulsiva de drogas en la adicción (Volkow *et al.*, 1996; Goldstein y Volkow, 2002). De hecho, algunos estudios clínicos han demostrado que niveles bajos de receptores D2 estriatales se asocian con impulsividad (Lee *et al.*, 2009; Everitt *et al.*, 2008) y, en roedores, la impulsividad predice la administración compulsiva de cocaína. Además, la sobreexpresión de D2R en el estriado interfiere con la toma compulsiva de alcohol (Thanos *et al.*, 2001) y cocaína (Thanos *et al.*, 2008).

Esta hipofrontalidad cortical se considera como un buen indicador de la disminución en la habilidad para controlar la búsqueda de drogas ya que los esfuerzos por evitar responder frente a estímulos asociados a cocaína, por ejemplo, incrementan la actividad del lóbulo frontal (Childress *et al.*, 1999); lo que sugiere que el deterioro de la función frontal podría estar implicado en la incapacidad para resistir la recaída.

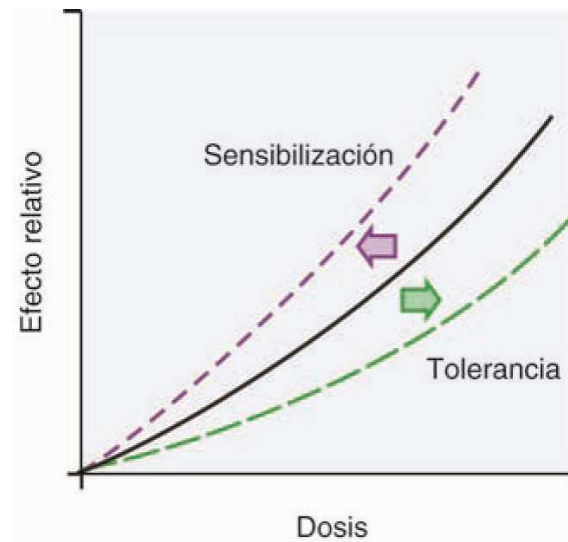
En una persona adicta, la búsqueda y el consumo de drogas se convierten en los principales motivadores desplazando a todas las demás actividades (Volkow *et al.*, 2003). La modulación de esta motivación por estímulos vinculados a las drogas puede ocurrir aún de manera inconsciente.

### **Tolerancia**

La tolerancia es la reacción más frecuente al consumo repetitivo de la misma droga, y se caracteriza como una reducción en la respuesta frente a la exposición repetida de una droga determinada. Esto lleva a un corrimiento hacia la derecha en la curva dosis-respuesta a una droga de manera que se necesita una dosis más alta para obtener el efecto antes



logrado con una dosis más baja (Figura 12). Existen muchas modalidades de tolerancia cuyo origen puede deberse a diversos mecanismos. La tolerancia puede desarrollarse frente a ciertos efectos de una droga con mucha mayor rapidez que a otros de la misma sustancia (O'Brien, 2011).



**Figura 12. Cambios en la curva dosis-respuesta frente a la tolerancia o la sensibilización.** Con la tolerancia (curva verde) hay un corrimiento de la curva hacia la derecha. Con la sensibilización (curva violeta) hay un corrimiento hacia la izquierda. Tomado de O'Brien, 2011.

### Sensibilización

Frente a drogas estimulantes, como la cocaína o la anfetamina, puede ocurrir tolerancia reversa o sensibilización, que implica un corrimiento hacia la izquierda en la curva dosis-respuesta (Figura 12). La sensibilización se define como el aumento de la respuesta a un estímulo luego de exposiciones repetidas a dicho estímulo (Pierce y Kalivas, 1997; Post y Rose, 1976). Cuando se trata de drogas psicoestimulantes, la sensibilización se caracteriza por un aumento en la respuesta motora que ocurre frente a exposiciones repetidas intermitentes a una droga específica y es un fenómeno de larga duración ya que persiste hasta por lo menos un año después de la última exposición a la droga (Paulson *et al.*, 1991). Se observó que ocurre sensibilización conductual (*behavioral sensitization*) en respuesta a cocaína (Post *et al.*, 1992), anfetamina (Robinson y Becker, 1986), morfina (Joyce e Iversen, 1979), etanol (Cunningham y Noble, 1992), nicotina (Benwell y Balfour, 1992), y  $\Delta^9$ -tetrahidrocanabinol (Cadoni *et al.*, 2001). También se observó que puede

ocurrir sensibilización cruzada entre distintas drogas (Steketee y Kalivas, 2011). Esto sugiere que existen mecanismos comunes en el proceso de sensibilización, a pesar de que diversas drogas tengan distintos sitios de acción.

La exposición de pacientes adictos a estímulos ambientales asociados con el consumo de drogas, les genera ansiedad y puede promover la recaída (O'Brien *et al.*, 1992). Tanto la sensibilización como las recaídas son dependientes del contexto. Por lo tanto, la sensibilización a cocaína podría explicarse en parte por una respuesta condicionada. El condicionamiento por el ambiente puede influenciar tanto la iniciación como la expresión de la sensibilización conductual. Ratas expuestas repetidas veces a drogas como cocaína o anfetamina (iniciación) expresan una sensibilización más robusta cuando son re-expuestas a la misma droga en el mismo ambiente que ratas expuestas a la droga en un ambiente diferente (Vezina *et al.*, 1989; Mattson *et al.*, 2008; Vezina y Leyton, 2009). La sensibilización en el ambiente apareado a la droga se conoce como sensibilización dependiente del contexto (Tilson y Rech, 1973; Crombag *et al.*, 2000) en oposición a la sensibilización independiente del contexto que ocurre en paradigmas no apareados (Steketee y Kalivas, 2011).

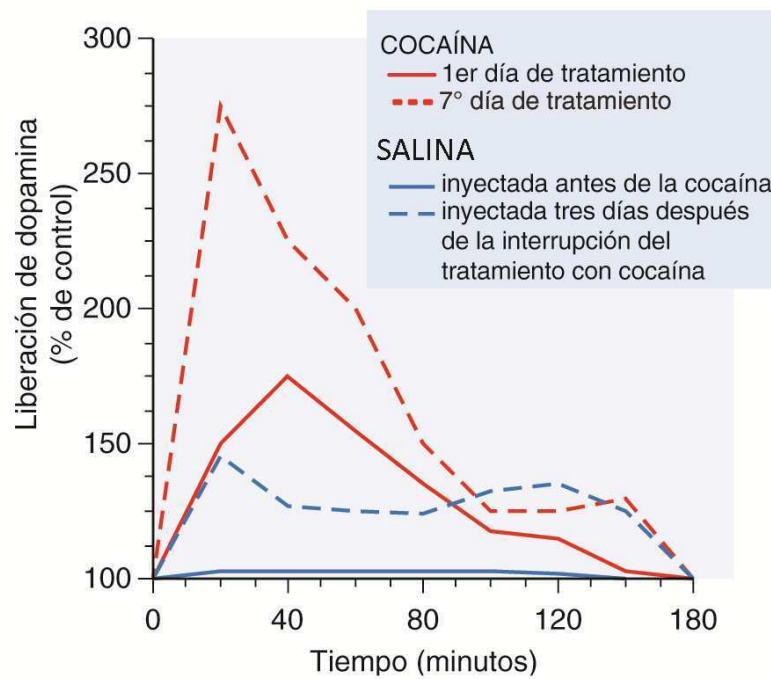
La sensibilización conductual también puede evidenciarse a través de experimentos de condicionamiento por preferencia de lugar (CPP por *conditioned place preference*; Cunningham *et al.*, 2006) o de autoadministración de drogas. Hay reportes que sostienen que la exposición previa a un número de drogas (cocaína, anfetamina, morfina) lleva a (i) un aumento en el CPP (Lett *et al.*, 1989) y también (ii) facilita la adquisición en paradigmas de autoadministración de drogas además de aumentar la motivación por conseguir la droga una vez que el comportamiento fue adquirido (Vezina, 2002). También, la autoadministración de drogas induce sensibilización locomotora en respuesta a exposiciones no contingentes (administradas por el investigador) de la droga (Vezina, 2004).

El desarrollo de la sensibilización puede dividirse en dos fases, la iniciación y la expresión. La iniciación consiste en los eventos neurales inmediatos que inducen la sensibilización conductual y la expresión en las consecuencias a largo plazo de esos eventos iniciales (Kalivas y Stewart, 1991).

Basándose en experimentos de inyecciones intracraniales de drogas, se determinó inicialmente que la acción de las drogas sobre el VTA es responsable de la iniciación de la sensibilización, mientras que la acción sobre el NAcc es responsable de la expresión de esa sensibilización (Steketee y Kalivas, 2011). Estudios mediante lesiones cerebrales dirigidas implicaron a la corteza prefrontal medial (CPFm) en el desarrollo de la sensibilización conductual. Además del circuito mesocorticolímbico (VTA, NAcc, CPF), el pálido ventral, el hipocampo, la amígdala, el núcleo tegmental laterodorsal y el núcleo paraventricular fueron involucrados en el desarrollo de la sensibilización. Es probable que cada una de estas regiones module el desarrollo de la sensibilización influenciando el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico (Steketee y Kalivas, 2011).

La sensibilización conductual está asociada con un aumento en la transmisión dopaminérgica. La sensibilización locomotora en etapas tempranas se debe al aumento en la actividad y excitabilidad de las neuronas dopaminérgicas del VTA (Kalivas y Duffy, 1993). Animales ya sensibilizados muestran un aumento en la liberación de dopamina en el NAcc durante la re-exposición a la droga (Figura 13). También se observaron alteraciones en la CPFm, donde la abstinencia de corto plazo está asociada con una disminución, mientras que la abstinencia prolongada está asociada con un aumento en la transmisión dopaminérgica.

En humanos se reportó que voluntarios que recibieron tres inyecciones no contingentes de anfetaminas en un entorno de laboratorio mostraron una mayor liberación de dopamina en el NAcc en respuesta a un desafío con anfetamina 2 semanas y 1 año más tarde, medida por una disminución de [<sup>11</sup>C]raclopride (Boileau *et al.*, 2006). Además, un informe reciente ha demostrado que en los consumidores de cocaína no adictos, la administración intranasal de la droga incrementa la liberación de dopamina en el estriado ventral. La diferencia con estudios anteriores en humanos y primates no humanos, donde no se veían signos de sensibilización fue que la liberación de dopamina evocada por cocaína se llevó a cabo en presencia de señales asociadas a la droga. Además, el grado de liberación de dopamina se correlacionó positivamente con la historia previa con respecto al uso de psicoestimulantes, lo que sugiere que la respuesta de la dopamina aumenta con el uso repetido de la droga (Cox *et al.*, 2009).



**Figura 13. Cambios en la liberación de dopamina en el SNC inducidos por la cocaína.** Se midió por diálisis la liberación de dopamina en el NAcc de ratas luego de inyecciones i.p. diarias con solución salina (SALINA, curvas azules) o con cocaína (COCAÍNA, curvas rojas) (10 mg/kg) por 7 días. Adaptado de Kalivas y Duffy, 1990. Adaptado de O'Brien, 2011.

Los cambios que subyacen en el proceso de sensibilización son complejos, ya que los que se manifiestan en las primeras etapas de respuesta a la droga no se mantienen en etapas posteriores, cuando se manifiesta la sensibilización (Pierce y Kalivas, 1997). Después de períodos de espera largos (mayores a 14 días), la expresión de la sensibilización conductual está asociada de manera consistente con el aumento de la transmisión dopaminérgica (Heidbreder *et al.*, 1996; Hooks *et al.*, 1994; Kalivas y Duffy, 1993; Kolta *et al.*, 1985; Paulson y Robinson, 1995; Wolf *et al.*, 1993). Mientras que la sensibilización es generalmente reportada durante e inmediatamente después del cese del tratamiento con drogas, algunos estudios encuentran que la intensidad de la respuesta de sensibilización aumenta con tiempos de espera más largos (Hooks *et al.*, 1994, Kalivas y Duffy, 1993, Kolta *et al.*, 1985, Paulson y Robinson, 1995).

La unión de dopamina a sus receptores juega un papel clave en la sensibilización. El aumento en la excitabilidad de las neuronas dopaminérgicas del VTA está asociado con una disminución en la sensibilidad de autorreceptores D2 (White y Wang, 1984). Además, inyecciones repetidas dentro del VTA de bajas dosis del antagonista D2 eticlopride,

mejoraron la respuesta a anfetamina (Tanabe *et al.*, 2004). El bloqueo de los receptores D1 en el VTA durante la fase inicial impide el desarrollo de la sensibilización a anfetamina (pero no a cocaína; Stewart y Vezina, 1989; Steketee, 1998); y agonistas de receptores "tipo D1" en el VTA aumentaron la sensibilización a la cocaína (Pierce *et al.*, 1996).

Estudios electrofisiológicos mostraron que la exposición a drogas de abuso induce LTP (potenciación a largo plazo) en las neuronas dopaminérgicas del VTA (Ungless *et al.*, 2001; Saal *et al.*, 2003; Borgland *et al.*, 2004). La duración de este LTP puede extenderse hasta los 3 meses si la administración de la droga es en forma contingente (Saal *et al.*, 2003; Schilström *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2008). El LTP inducido por cocaína en el VTA resulta de la inserción de receptores AMPA (α-amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazolepropionato) con permeabilidad aumentada al  $Ca^{2+}$  (Bellone y Lüscher, 2005; Mameli *et al.*, 2007; Argilli *et al.*, 2008). Como consecuencia de la sensibilidad aumentada de receptores AMPA, las neuronas del VTA son más respondedoras a glutamato (White *et al.*, 1995b; Zhang *et al.*, 1997).

Sumado a la disminución en la sensibilidad de los autorreceptores D2 (White y Wang, 1984; Henry *et al.*, 1989), la exposición repetida a drogas de abuso, produce aumentos transientes en la liberación somatodendrítica de dopamina en el VTA (Kalivas y Duffy, 1993) por aumento de la actividad neuronal. Este incremento en la actividad de la vía mesocorticolímbica aumenta la dopamina liberada en CPFm que actúa sobre receptores D1 y aumenta la liberación de glutamato de las neuronas que proyectan sobre el VTA induciendo LTP (Kalivas y Duffy, 1995; Ungless *et al.*, 2001; Saal *et al.*, 2003). Las proyecciones de la CPFm hacia el VTA pueden ser directas o indirectas (Omelchenko y Sesack, 2005, 2007; Nelson *et al.*, 2007). Además las funciones de D2R y receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) están reducidas (Beyer y Steketee, 2002; Bowers *et al.*, 2004), favoreciendo también el aumento en la excitabilidad de las neuronas de proyección. El glutamato, cuya liberación está aumentada, puede actuar sobre los receptores AMPA para promover la liberación de dopamina en el NAcc (Karreman *et al.*, 1996; Ungless *et al.*, 2010). La mayor liberación de dopamina en el NAcc puede actuar sobre los D1R para promover la sensibilización conductual (Giorgetti *et al.*, 2001).

A diferencia del VTA, la administración repetida de cocaína disminuye la capacidad de respuesta neuronal al glutamato en el NAcc (White *et al.*, 1995a). La sensibilización se asocia con niveles de glutamato reducidos en el NAcc, mientras que inyecciones agudas de

cocaína o anfetaminas en animales sensibilizados producen una mayor liberación de glutamato en esta región (Pierce *et al.*, 1996a; Reid y Berger, 1996; Baker *et al.*, 2002, Kim *et al.*, 2005). Así, niveles basales reducidos de glutamato observados en animales sensibilizados permitirían una mayor liberación de glutamato en respuesta a una nueva administración de la droga que actúa sobre receptores AMPA y promueve la expresión de la sensibilización conductual (Xi *et al.*, 2002; Pierce *et al.*, 1996a; Ghasemzadeh *et al.*, 2003). Animales en abstinencia muestran un aumento de la relación AMPA/NMDA en el NAcc, indicativo de LTP (Kourrich *et al.*, 2007).

Finalmente, algunos estudios plantean la posibilidad de que la exposición repetida a cocaína produzca un aumento en la permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  de receptores AMPA en el hipocampo y la amígdala; sugiriendo que la neurotransmisión del circuito mesolímbico podría verse reforzada por el aumento en la liberación de glutamato en VTA y NAcc a partir de proyecciones desde el hipocampo y la amígdala, respectivamente (Shinonaga *et al.*, 1994; Lodge y Grace, 2008; Sepehrizadeh *et al.*, 2008).

## OBJETIVOS GENERALES DE LA TESIS

El estudio de los D2R *in vivo* ha presentado limitaciones debido a la falta de compuestos selectivos que sean capaces de discriminar entre los distintos subtipos presentes en la subfamilia de receptores dopaminérgicos "tipo D2" que incluye al D2, D3 y D4. Para avanzar en la resolución de este problema se recurrió, hace ya varios años, a la generación de ratones mutantes deficientes en D2R con técnicas de genética molecular, a pesar de que el estudio de un receptor en ratones que no pueden expresarlo parezca una solución contradictoria. Solamente el análisis comparativo de estos ratones mutantes nulos con hermanos normales permite extraer conclusiones significativas acerca de las posibles funciones del gen mutado.

A pesar de que el estudio de ratones deficientes para el D2R permitió asignar funciones a este receptor, el análisis de los fenotipos de estos ratones mutantes nulos encontró limitaciones en la interpretación de resultados debido a la presencia de múltiples fenotipos superpuestos (centrales y periféricos) y, en especial, a la aparición de programas alternativos de desarrollo que tienden a compensar la ausencia de receptores D2 funcionales. Otra limitación de este modelo es que la pérdida de expresión del D2R es total en todo el ratón impidiendo el estudio particularizado de la función del D2R en tipos celulares o circuitos neuronales específicos.

El **objetivo general** de esta tesis fue generar ratones con mutaciones condicionales que permitan estudiar de manera particularizada las funciones *in vivo* que los D2R desempeñan en distintos tipos de neuronas o en diferentes momentos de la vida del animal.

Los **objetivos particulares** fueron:

1. Estudiar el rol de los D2R presinápticos (autorreceptores) en la regulación de la neurotransmisión dopaminérgica central y su participación en la actividad locomotora, en conductas asociadas a la obtención de recompensas y en la sensibilidad a drogas de abuso.
2. Evaluar los efectos de la pérdida de los D2R en animales adultos y compararlos con los fenotipos encontrados en mutantes clásicos *Drd2<sup>-/-</sup>* que tienden a compensar la pérdida temprana del D2R con el fin de determinar cuál de los dos modelos mutantes permite sacar conclusiones acerca de la función de este receptor.

# **CAPÍTULO 1**

**Estudio del rol de los autorreceptores D2 en la regulación de la neurotransmisión dopaminérgica.**



## Introducción

---

### Liberación y recaptación de dopamina

Los niveles de dopamina extracelular resultan de un equilibrio dinámico entre liberación y recaptación del neurotransmisor. Ambos procesos están regulados por varios mecanismos. La relación entre ellos y los distintos tipos de actividad que presentan las neuronas dopaminérgicas permitirá que la dopamina pueda ejercer sus funciones normalmente.

Las neuronas dopaminérgicas muestran dos patrones de actividad diferentes: la actividad "tónica" que es continua y de baja frecuencia, y la actividad "fásica" que es en ráfagas y de frecuencias más altas (Grace y Bunney, 1984). Los niveles de dopamina extracelular que se alcancen dependerán de la tasa y patrón de disparo de las neuronas (Patel *et al*, 1992; Kawagoe *et al*, 1992; Rice *et al*, 1997; Cragg, 2003; Beckstead *et al*, 2007).

Cuando las neuronas dopaminérgicas disparan en forma tónica, la pausa entre dos potenciales de acción es de 200 ms; por lo tanto, la dopamina liberada por un potencial de acción es completamente recaptada antes de la llegada del siguiente a través del transportador de dopamina (DAT; Gonon, 1988; Suaud-Chagny *et al*, 1992). Cuando la actividad se da en ráfagas (*bursts*), el DAT no llega a remover toda la dopamina liberada y la concentración aumenta por acumulación de dopamina extracelular (Chergui *et al*, 1994). Como los receptores D1 tienen menor afinidad por la dopamina que los D2R (Richfield *et al*, 1989), se requiere una acumulación extracelular de dopamina mayor para activar en forma significativa los receptores D1 postsinápticos (Chergui *et al*, 1996 y 1997; Gonon, 1997) y los autorreceptores D2 que se encuentran en densidad muy inferior al de los D2R postsinápticos (Benoit-Marand *et al*, 2001).

La dopamina liberada en forma fásica señala la información relacionada con la predicción de recompensas u otros estímulos salientes (Schultz, 1998; Matsumoto y Hikosaka, 2009), por lo que es importante para la adquisición y refuerzo de las conductas de búsqueda y selección de los programas motores que conducen a la obtención de la recompensa (Jin y Costa, 2010). Estas señales fásicas que conducen a un aumento discreto de la concentración de dopamina pueden ser detectadas por medio de voltametría cíclica de barrido rápido (FSCV, *fast scan cyclic voltametry*) *in vivo* (Phillips *et al*, 2003; Roitman *et al*,

2004; Stuber *et al*, 2005; Gan *et al*, 2010) con electrodos de fibra de carbón.

Una neurona puede cambiar de un patrón de disparo a otro (Schmitz *et al.*, 2003) dependiendo de las aferencias excitatorias e inhibitorias que reciba (Kitai *et al.*, 1999) y pueden ser moduladas por los niveles de dopamina extracelular (Paladini *et al.*, 2003). Por ejemplo, el tratamiento con antagonistas de receptores tipo D2 *in vivo* puede cambiar el patrón de actividad tónica a fásica.

La dopamina es recaptada por los terminales sinápticos a través del DAT, una proteína de membrana que pertenece a la familia de transportadores de aminas biogénicas, con 12 dominios de pasos transmembrana. En las regiones densamente invadas por terminales dopaminérgicos, la recaptación de dopamina mediada por el DAT es el mecanismo más importante para la terminación de la transmisión (Jones *et al.*, 1998b; Benoit-Marand *et al.*, 2000). En las regiones cerebrales menos invadas por terminales dopaminérgicos, como la amígdala, la corteza prefrontal y la corteza cingulada, la recaptación de dopamina es mucho más lenta que en el estriado dorsal (Garris y Wightman, 1994). Se reportó que la actividad del DAT es menos eficiente en el NAcc que en el estriado dorsal (Stamford *et al.*, 1988b; Cass *et al.*, 1992; Suaud-Chagny *et al.*, 1995).

Se postuló que los autorreceptores podían regular la actividad del DAT (Dickinson *et al.*, 1999; Schmitz *et al.*, 2002, Wu *et al.*, 2002). El mecanismo no está claro y podría involucrar cambios en la fosforilación del DAT, cambios en el tráfico a la membrana, o cambios en los niveles de expresión del DAT (Schmitz *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2007).

### **Control de la liberación de dopamina por receptores presinápticos. Autorreceptores.**

Las neuronas dopaminérgicas expresan receptores "tipo D2" en los terminales axónicos y en toda su extensión somatodendrítica (Sesack *et al.*, 1994). Su estimulación provee de una retroalimentación negativa y regula la liberación de dopamina, su síntesis y la actividad neuronal.

Se determinó que los autorreceptores somatodendríticos son del "tipo D2" basándose en su farmacología (Morelli *et al.*, 1988), sus características electrofisiológicas (Lacey *et al.*, 1987) y su biología molecular (Meador-Woodruff *et al.*, 1991). Los autorreceptores de los terminales en el estriado también fueron identificados como receptores "tipo D2" según su

farmacología (Boyar y Altar, 1987; Starke *et al.*, 1989) y electrofisiología (Tepper *et al.*, 1984a, b).

Existen controversias sobre la posibilidad de que también receptores D3 estén actuando como autorreceptores. Varios trabajos han reportado la presencia de ARNm del receptor D3 en la sustancia nigra (SN) y el área tegmental ventral (VTA) (Sokoloff *et al.*, 1990; Bouthenet *et al.*, 1991), mientras que otros estudios han fallado en encontrarlo o sólo fue posible detectarlo en muy baja cantidad (Valerio *et al.*, 1994; Diaz *et al.*, 1995; Le Moine y Bloch, 1996). También se ha postulado la presencia de autorreceptores D3 sobre la base de estudios farmacológicos que utilizaban compuestos selectivos para el receptor D3 (Meller *et al.*, 1993; Tang *et al.*, 1994; Chesi *et al.*, 1995; Kreiss *et al.*, 1995; Lejeune y Millan, 1995; Nissbrandt *et al.*, 1995). Sin embargo, está fuertemente cuestionada la existencia de compuestos con selectividad específica para un subtipo de receptor particular (Gingrich y Caron, 1993; Seeman y Van Tol, 1994; Burris *et al.*, 1995). Tampoco se encontraron déficits en la función de los autorreceptores en ratones mutantes nulos para el receptor D3, a pesar de haberse encontrado elevada la concentración de dopamina extracelular (Koeltzow *et al.*, 1998); ni autorreceptores D3 en ratones mutantes nulos para el D2R (Davila *et al.*, 2003).

Existen dos isoformas del D2R, una forma corta o D2S (por *short*) y una forma larga o D2L, que se generan por *splicing* alternativo del exón 6 (Tan *et al.*, 2003). En ratones deficientes en D2L, todavía estaba presente la función de autorreceptor, lo que sugirió que los D2S podrían actuar como receptores presinápticos, mientras que los D2L serían principalmente postsinápticos (Usiello *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000; Centonze *et al.*, 2002). De todas maneras, ambas isoformas podrían estar contribuyendo en ambas funciones (Khan *et al.*, 1998).

### **Liberación**

La activación de autorreceptores inhibe la liberación de dopamina tanto en los terminales axónicos (Seeman y Lee, 1975; Starke *et al.*, 1978; Cubeddu y Hoffmann, 1982; Gonon y Buda, 1985; Dwoskin y Zahniser, 1986; Mayer *et al.*, 1988; Stamford *et al.*, 1988a; May y Wightman, 1989; Palij *et al.*, 1990; Suaud-Chagny *et al.*, 1991; Kennedy *et al.*, 1992; Cragg y Greenfield, 1997) como en la zona somatodendrítica (Cragg y Greenfield, 1997), regulando, así, la concentración extracelular de dopamina (Schmitz *et al.*, 2002).

El mecanismo por el cual los autorreceptores inhiben la liberación de dopamina no está claro aún. Una posibilidad es que los autorreceptores D2 inhiban canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje-dependientes, disminuyendo la exocitosis mediada por  $\text{Ca}^{2+}$  (Cardozo y Bean, 1995; Chen *et al.*, 2006; Phillips y Stamford, 2000). Otra posibilidad no excluyente es que la estimulación de autorreceptores D2 aumente la probabilidad de apertura de canales de  $\text{K}^+$  (Martel *et al.*, 2011; Zhang y Sulzer, 2012) generando una hiperpolarización local en los sitios de liberación.

### **Síntesis**

Los autorreceptores D2 son capaces de modular la síntesis de dopamina disminuyendo la actividad de la tirosina hidroxilasa (TH) (Kehr *et al.*, 1972; Roth *et al.*, 1975; Kapatos y Zigmond, 1979; Haubrich y Pflueger, 1982; Wolf y Roth, 1990; O'Hara *et al.*, 1996). El mecanismo probablemente consista en la inhibición de la adenilato ciclasa y la fosforilación diferencial de TH dependiente de AMPc (Salah *et al.*, 1989; Lindgren *et al.*, 2001).

### **Actividad neuronal**

Los autorreceptores pueden modular el potencial de membrana de las neuronas dopaminérgicas. La estimulación de D2R lleva a la hiperpolarización del potencial de membrana y disminuye la tasa de disparo de las neuronas (Silva y Bunney, 1988; Mercuri *et al.*, 1997). El tratamiento con antagonistas de D2R *in vivo* aumenta la frecuencia de disparos espontáneos de las neuronas dopaminérgicas (Schmitz *et al.*, 2003). No está claro aún cuánto está contribuyendo el autorreceptor D2 a este fenómeno (Bunney y Grace 1978; Grace *et al.*, 1997; Paladini *et al.*, 2003).

El curso temporal de la inhibición de la liberación de dopamina mediada por autorreceptores es variable según el trabajo pero, en promedio, inicia entre 50 y 100 ms hasta 300 y 550 ms, y dura 800 ms, aproximadamente (Phillips *et al.*, 2002, Benoit-Marand *et al.*, 2001; Schmitz *et al.*, 2002). Niveles basales de actividad tónica, mantendrían levemente inhibida la liberación. Cuando la actividad pasa a ser fásica, la inhibición no sería tan importante durante los primeros disparos pero luego aumentaría si se mantiene una actividad sostenida (Schmitz *et al.*, 2003).

## Heterorreceptores

Además de la presencia de autorreceptores D2, existen otros receptores presentes en los terminales y cuerpos de las neuronas dopaminérgicas que regulan la actividad neuronal y la liberación, aunque su rol todavía no está tan claro (Zhang y Sulzer, 2012). Muchas drogas incluyendo nicotina, etanol, opioides, morfina y cannabinoides, son capaces de aumentar la actividad de las neuronas dopaminérgicas actuando directamente sobre ellas o indirectamente a través de mecanismos de desinhibición mediado por interneuronas.

Hasta el momento, los receptores detectados por técnicas de inmunomarcación ultraestructural son receptores de GDNF (*glial-derived neurotrophic factor*) (Araujo *et al.*, 1997), receptores nicotínicos (Wonnacott *et al.*, 2000), receptores opioides delta y kappa (Svingos *et al.*, 1999; Svingos *et al.*, 2001), el receptor glutamatérgico metabotrópico mGluR1 (Paquet *et al.*, 1997), el receptor muscarínico M5 (Vilaro *et al.*, 1990), y probablemente el receptor GABA(B) (Charara *et al.*, 2000).

La estimulación de receptores mGluR1 (Zhang y Sulzer, 2003), GABA(B) (Schmitz *et al.*, 2002), GABA(A) (Ronken *et al.*, 1993), M3 (muscarínico) (Zhang *et al.*, 2002), y A1 (adenosina) (Quarta *et al.*, 2004) inhibe la liberación de dopamina. Por otro lado, la estimulación de receptores muscarínicos M4 y M5 (Zhang *et al.*, 2002), y de adenosina A2A (Golembiowska y Zylewska, 1998) facilita su liberación.

La estimulación de receptores nicotínicos aumenta la liberación de dopamina (Pontieri *et al.*, 1996) aunque frente a altas frecuencias de actividad dopaminérgica o con la aplicación de altas concentraciones de nicotina se desensibilizan (Rice y Cragg, 2004; Zhou *et al.*, 2001).

Las neuronas del VTA pueden producir cannabinoides que activan receptores CB1 de manera local. Se demostró que la inhibición de la liberación de dopamina mediada por autorreceptores podía ser atenuada por la activación de receptores CB1 (O'Neill *et al.*, 2009).

Agonistas de receptores de opioides *mu* y *delta* disminuyen la concentración de dopamina evocada por pulsos simples, pero aumentan su liberación con trenes de estimulación a través de un efecto indirecto mediado por interneuronas colinérgicas. Por el contrario,

agonistas de receptores *kappa* situados en terminales dopaminérgicos, suprimen la liberación de dopamina (Britt y McGehee, 2008).

### **Desbalances de la neurotransmisión dopaminérgica**

Estudios anatómicos muestran que el árbol axonal de las neuronas dopaminérgicas ocupa casi el 6 % del volumen del estriado (Matsuda *et al.*, 2009). También se reportó que en una determinada situación los niveles de dopamina pueden aumentar en una zona determinada y disminuir en otra (Rice *et al.*, 2011) Entonces, ¿cómo se logra la señalización de dopamina en forma espacialmente discreta?

La regulación de la neurotransmisión se produce en distintos niveles a través de diversos mecanismos que finalmente regulan la manera en que se va a liberar la dopamina y cómo ésta va a señalar los programas de acción que serán seleccionados en función de la obtención de recompensas. Desbalances en la neurotransmisión podrían desencadenar en desórdenes de las conductas reguladas por la dopamina como se reportó previamente en enfermedades como Parkinson, esquizofrenia, adicción, obesidad, conductas compulsivas, etc. Consideramos que es necesario el entendimiento detallado de los mecanismos que funcionando normalmente, permiten que el tono general de la neurotransmisión dopaminérgica juegue un papel importante en la regulación de la frecuencia y del curso temporal de las selecciones de conductas (Robbins y Brown, 1990; Redgrave *et al.*, 1999).

## Objetivos

---

Si bien existen numerosos estudios que reportan funciones de los autorreceptores D2, todavía no fue posible estudiar cuán importante es la regulación que ejercen y qué tipo de conductas se ven afectadas por su funcionamiento. Hasta el comienzo de este trabajo, el estudio directo de los autorreceptores de dopamina se había visto impedido por la ausencia de compuestos farmacológicos que logren discriminar entre receptores presinápticos y postsinápticos.

### Objetivos generales

Estudiar la relevancia de los autorreceptores D2 en la regulación dopaminérgica y la contribución de esta regulación negativa *in vivo* en conductas relacionadas con la neurotransmisión dopaminérgica mediante el diseño de un modelo experimental *in vivo* novedoso.

### Objetivos específicos

#### Objetivo 1

Generar ratones mutantes deficientes en autorreceptores dopaminérgicos D2 delecionando el gen del *Drd2* de neuronas dopaminérgicas (autoDrd2KO) y validar el nuevo modelo animal.

#### Objetivo 2

Evaluar la importancia del control inhibitorio mediado por los autorreceptores D2 estudiando posibles alteraciones en la neurotransmisión dopaminérgica, la actividad locomotora espontánea mediada por dopamina y en las propiedades reforzantes de la comida y la cocaína.

## Resultados

---

### Generación de ratones sin autoreceptores D2

Para estudiar el grado de participación de los autorreceptores D2 en el control de la neurotransmisión dopaminérgica *in vivo*, decidimos generar ratones mutantes que permitieran inducir una delección específica de estos D2R exclusivamente en neuronas de dopamina sin alterar su expresión en neuronas postsinápticas.

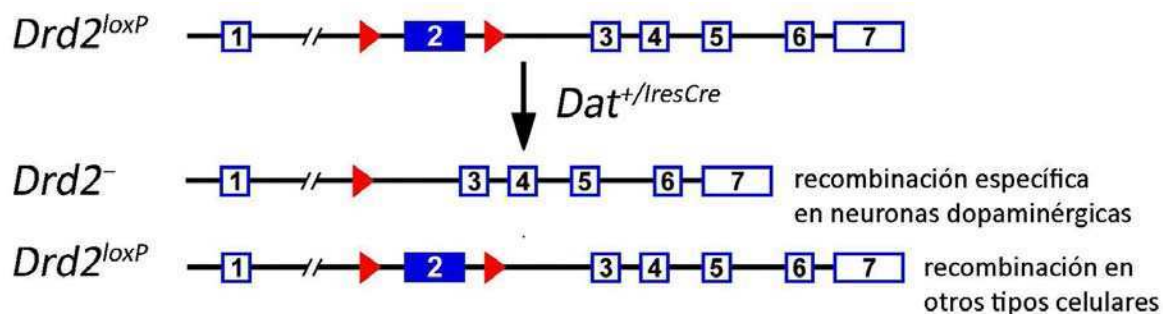
Para eso fue necesario cruzar dos líneas de ratones: por un lado, un mutante condicional para el gen del D2R; y por el otro, ratones que expresan la recombinasa *Cre* exclusivamente en neuronas de dopamina (Figura 1).

Los ratones mutantes condicionales para el gen del D2R se generaron como parte de la tesis doctoral del Dr. Diego Gelman en este laboratorio. Mediante recombinación homóloga en células embrionarias multipotentes (*ES cells*) se incorporaron dos sitios *loxP* flanqueando al exón 2 (exón donde se encuentra el codón de iniciación de la traducción). Este alelo modificado fue llamado *Drd2<sup>loxP</sup>*. Posteriormente, durante el trabajo doctoral de la Dra. Daniela Noaín, también en este laboratorio, se demostró que los ratones mutantes homocigotas *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* son indistinguibles de ratones *Drd2<sup>+/+</sup>* (*wild type*, wt) tanto desde el punto de vista molecular, neuroquímico, como conductual (Bello *et al.*, 2011).

Por otro lado, se decidió obtener ratones que expresaran *Cre* bajo el control transcripcional del transportador de dopamina (DAT), llamados *DAT<sup>+/iresCre</sup>*. Estos ratones fueron cedidos por la Dra. Cristina Bäckman (Bäckman *et al.*, 2006).

La elección de los ratones *DAT<sup>+/iresCre</sup>* se tomó teniendo en cuenta que todas las neuronas dopaminérgicas expresan el transportador de dopamina (Nirenberg *et al.*, 1996), por lo que se esperaba que al cruzar ratones *DAT<sup>+/iresCre</sup>* con ratones *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* se generaran ratones mutantes nulos para el D2R exclusivamente en neuronas dopaminérgicas (Figura 1; **Box 1**).





**Figura 1. Esquema de los alelos mutantes para el *Drd2*.** El exón 2 (azul lleno) está flanqueado por sitios *loxP* (triángulos rojos) y se escinde gracias a la acción de la recombinasa *Cre* en las neuronas dopaminérgicas, de manera que el alelo *Drd2<sup>loxP</sup>* se convierte en un alelo nulo *Drd2<sup>-</sup>* en ratones doble transgénicos *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>*. *DAT<sup>+/IresCre</sup>*. En otros tipos celulares el exón 2 no se deletiona y el alelo *Drd2<sup>loxP</sup>* permanece intacto.

Debido a que la introducción de mutaciones genómicas mediante recombinação homóloga puede llevar a conclusiones erróneas si no se homogeneiza el *background* genético de los ratones mutantes y los controles normales, se decidió retrocruzar los primeros mutantes obtenidos a la cepa C57Bl6/J por 10 generaciones. Los ratones C57Bl6/J son muy utilizados para experimentos conductuales ya que son más activos y más participativos que los de la cepa 129 (Crawley *et al.*, 1997) de la cual provienen las *ES cells* (Simpson *et al.*, 1997) donde se realizó la mutagénesis original. Los ratones *Dat<sup>IresCre</sup>* (Bello *et al.*, 2011; Bäckman *et al.*, 2006) también fueron retrocruzados a la cepa C57Bl6/J. Al momento de iniciar la tesis, el *background* genético de los animales *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* se encontraba ya homogeneizado en esta cepa; mientras que los *DAT<sup>+/IresCre</sup>* tuvieron que ser retrocruzados con ratones de la cepa C57Bl6/J por más de seis generaciones para homogeneizar el *background* genético en más del 99 %.

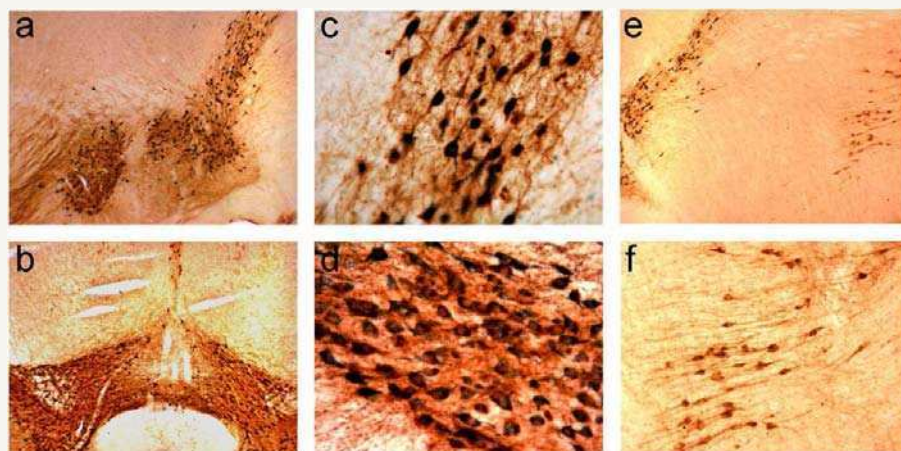
Realizamos cruza compuestas sucesivas hasta la obtención de animales doble transgénicos *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>*. *DAT<sup>+/IresCre</sup>* congénicos a los que llamamos autoDrd2KO cuidando de mantener el alelo *Cre* siempre en hemicigosis. Todos los ratones utilizados en la tesis fueron obtenidos de apareos de ratones *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* con ratones autoDrd2KO (**Box 2**).

El análisis y seguimiento genético de la colonia se realizó mediante ensayos de PCR detectando la presencia de secuencias *loxP* del gen *Drd2*, y la presencia del gen *Cre* en el locus del *Dat (Slc6a3)*.

### Box 1 Caracterización de la expresión de *Cre* en ratones *DAT<sup>+/iresCre</sup>*

El trabajo original que publicó los ratones *Dat<sup>iresCre</sup>* (Bäckman et al., 2006) mostraba la expresión de la recombinasa Cre colocalizando con el DAT en la mayoría de las neuronas que lo expresaban; pero no mostraba el porcentaje de colocalización de TH con el transgén. Estudios reportados previamente, muestran el DAT se expresa específicamente en las neuronas dopaminérgicas (incluso se utiliza como un marcador específico de este tipo neuronal) mientras que no lo hace en neuronas no dopaminérgicas ni en células de la glía (Augood *et al.*, 1993).

De todas maneras, decidimos hacer una caracterización en el laboratorio para determinar si las áreas de expresión del transgén se correspondían en su totalidad con las poblaciones de neuronas dopaminérgicas en las distintas zonas del cerebro. Para ello, los animales *DAT<sup>+/iresCre</sup>* fueron cruzados con animales reporteros obtenidos de *Jackson Laboratories*. Hicimos un barrido de la expresión de EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) en todo el cerebro para comprobar que el *Cre* se estuviera expresando únicamente en las poblaciones de neuronas dopaminérgicas. Para ello, hicimos ensayos de inmunohistoquímica detectando EGFP y TH y observando la colocalización de ambas proteínas. Pudimos comprobar que el *Cre* no se expresaba en las zonas de neuronas noradrenérgicas sino únicamente en las zonas dopaminérgicas. En el cerebro medio, la mayoría de las neuronas positivas para TH colocalizan con EGFP.

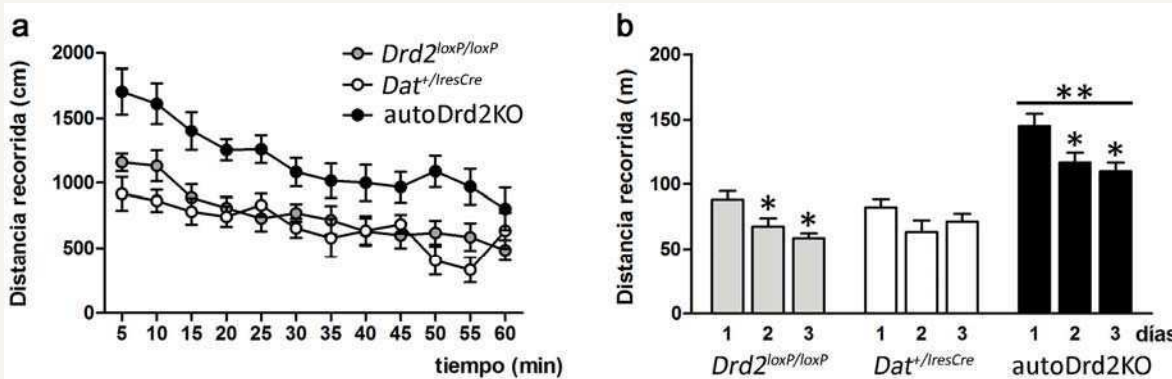


**Figura 2. Expresión de EGFP en neuronas dopaminérgicas.** (a-f) Inmunohistoquímica anti-TH (DAB) y anti-EGFP (BDHC). **a.** SN y VTA en corte sagital 5x. **b.** SN y VTA en corte coronal 5x. **c.** Aumento 20X de **a.** **d.** Aumento 20X de **b.** **e.** SN y *locus coeruleus* 5x. **f.** Aumento 10X del *locus coeruleus*. Se observa que en el cerebro medio (SN y VTA), en la mayoría de las neuronas colocalizan TH y EGFP. Esto no sucede en el *locus coeruleus*, una zona exclusivamente noradrenérgica.

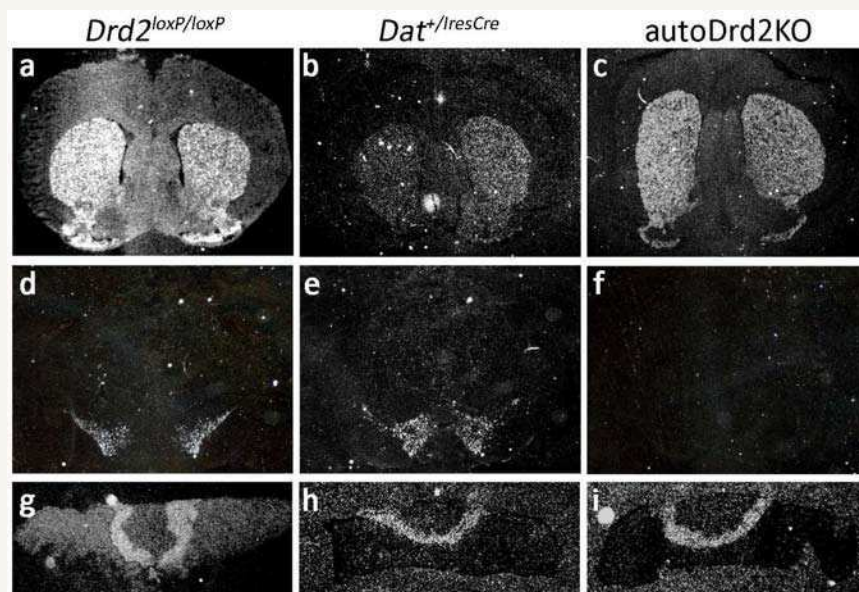
Como el objetivo de este trabajo consistía en realizar una delección total de los autorreceptores D2 de las neuronas dopaminérgicas, analizamos cuántas neuronas que expresaban TH en el cerebro medio también expresaban DAT. Este porcentaje fue alto y nos aseguraba su delección en todo el cerebro medio.

**Box 2**  
**Caracterización inicial de los ratones autoDrd2KO**

La sobreexpresión de *Cre* en líneas transgénicas no es inocua y puede tener efectos secundarios no deseados en la fisiología de los animales (Schmidt *et al.*, 2000; Adams y van der Weyden, 2001). Para determinar si la expresión de *Cre* en los ratones transgénicos alteraba la expresión del D2R, decidimos realizar mediciones preliminares en los primeros animales en n=7 de retrocruza y determinar si la línea parental *Dat*<sup>+/IresCre</sup> era similar a la línea *Drd2*<sup>loxP/loxP</sup>.



**Figura 3. Locomoción espontánea de ratones *Drd2*<sup>loxP/loxP</sup>, *Dat*<sup>+/IresCre</sup> y autoDrd2KO en n=7 de retrocruza a los 2 meses de edad. a.** Actividad locomotora durante el día 1 en intervalos de tiempo de 5 min. ANOVA de medidas repetidas. Genotipo: F(2,35)=29,92, *p*<0,0001. Tiempo: F(2,70)=12,78, *p*<0,0001. Interacción: F(4,70)=0,86, *p*=0,49136. **b.** Habituaación a lo largo de 3 días consecutivos. ANOVA de Medidas Repetidas. Genotipo: F(2,19)=7,61, *p*<0,01 Días: F(11,209)=19,68, *p*<0,0001. Interacción: F(22,209)=1,5950, *p*=0,04965. Análisis *post hoc* de Fisher. Referencias: \*diferencias significativas con respecto al día 1 de ese grupo; \*\*diferencias entre genotipos.

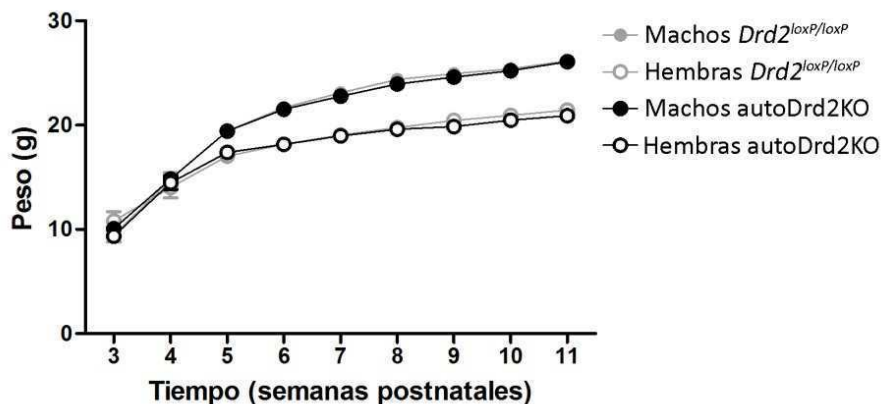


**Figura 4. Expresión del ARN mensajero del *Drd2*.** Se realizaron ensayos de hibridación *in situ* utilizando una sonda de ARN específica para el exón 2 sintetizada con [<sup>35</sup>S]-dUTP. Se muestra la expresión en ratones *Drd2*<sup>loxP/loxP</sup>; *Dat*<sup>+/IresCre</sup> y autoDrd2KO en el estriado (a, b, c), el cerebro medio (d, e, f) y la glándula pituitaria (g, h, i).

Las líneas parentales no presentan diferencias entre sí, de lo que inferimos que la expresión de *Cre per se* no tiene un fenotipo en sí misma en esta línea. Por esta razón, decidimos continuar con la línea *Drd2*<sup>loxP/loxP</sup> como única línea control, dado que eran hermanos de cría directos de los ratones autoDrd2KO.

## Caracterización general del modelo autoDrd2KO

Una vez obtenidos los animales autoDrd2KO, continuamos con su caracterización. Tanto los machos como las hembras de los ratones autoDrd2KO resultaron viables, mostraron curvas de crecimiento (Figura 5) y tasa de éxito reproductivo normales. Una inspección física y anatómica amplia no reveló diferencias fenotípicas evidentes con respecto a sus hermanos *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>*.

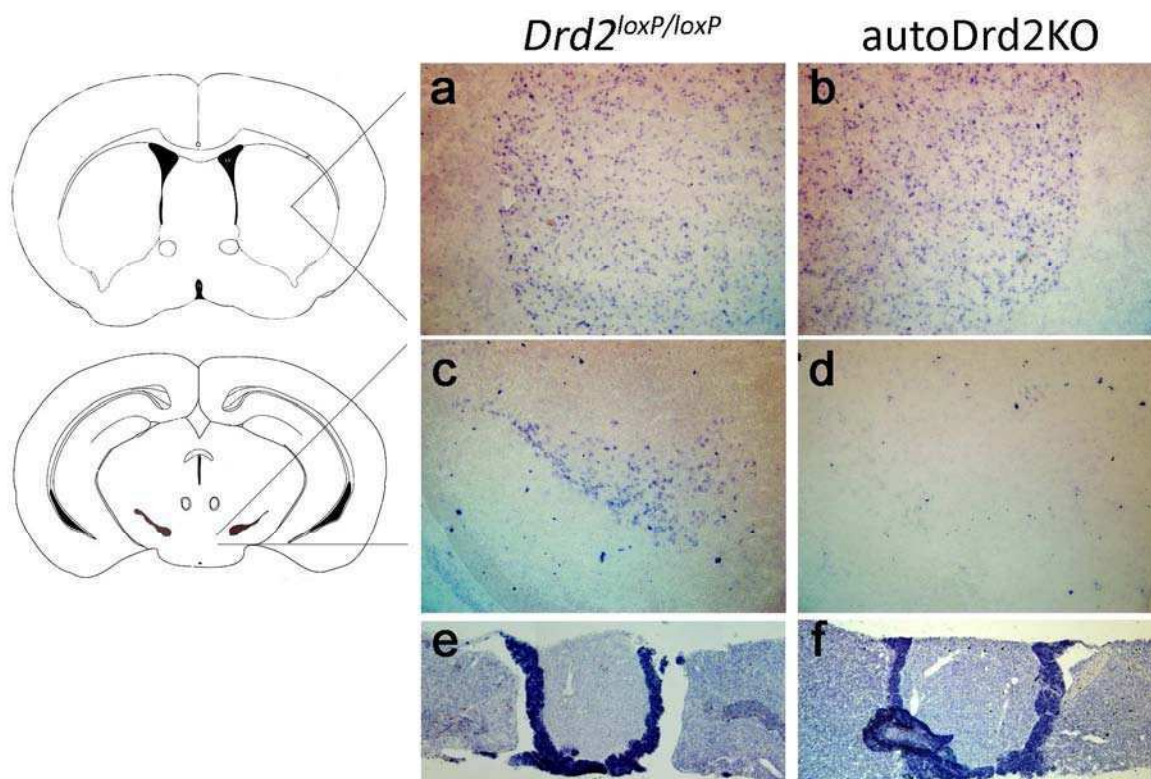


**Figura 5. Curvas de crecimiento de ratones autoDrd2KO y *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>*.** Ratones de ambos genotipos y ambos sexos fueron pesados desde la 3er semana postnatal hasta la semana 11. ANOVA de Medidas Repetidas. Genotipo:  $F(1,46)=0,11$ ,  $p=0,74$ . Tiempo:  $F(8,368)=920,46$ ,  $p<0,0001$ . Interacción Genotipo\*Tiempo:  $F(8,368)=1,05$ ,  $p=0,40$ . Interacción Genotipo\*Tiempo\*Sexo:  $F(8,368)=1,62$ ,  $p=0,12$ .

## Caracterización neuroquímica

Para verificar que efectivamente, los D2R estaban siendo delecionados de las neuronas dopaminérgicas analizamos la expresión del RNA mensajero del *Drd2* mediante ensayos de hibridación *in situ*. Utilizamos una sonda radiactiva que detecta únicamente el exón 2. Los ratones autoDrd2KO mostraron una pérdida total de la expresión del *Drd2* en las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio pero mantuvieron su expresión en las neuronas postsinápticas del cerebro anterior y células de la hipófisis (Figura 6).



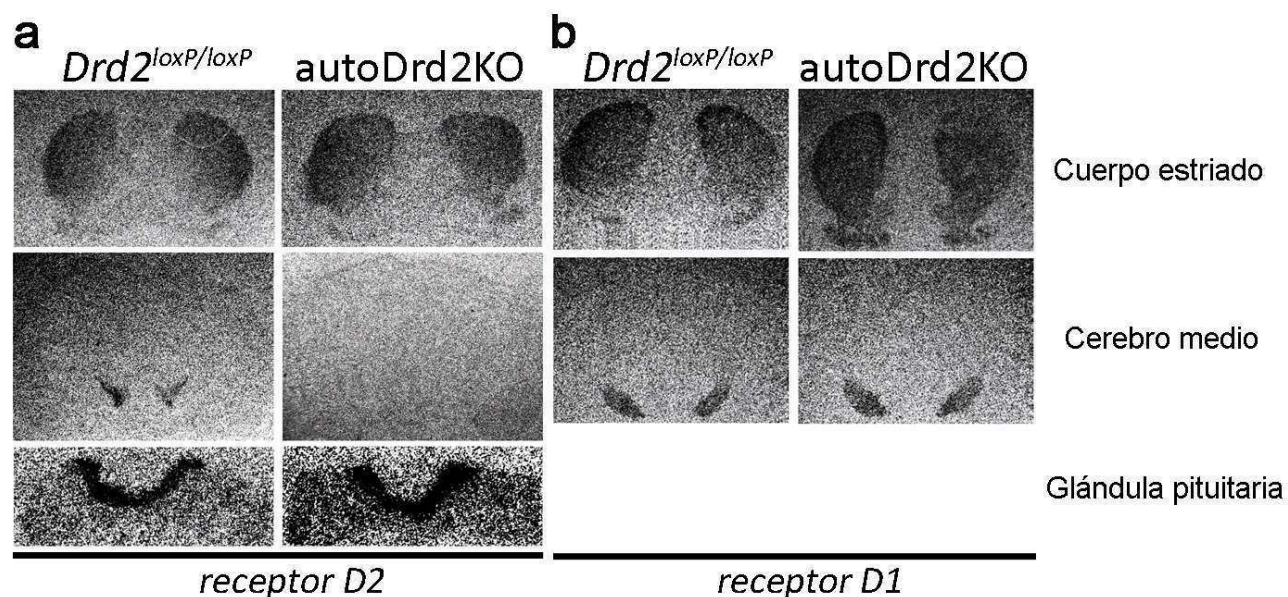


**Figura 6. Expresión del ARN mensajero para el receptor D2.** Ensayo de hibridación *in situ* utilizando una sonda no radiactiva marcada con digoxenina para el exón 2 del *Drd2*. Se muestra la expresión del receptor D2 en el estriado (a y b), en el cerebro medio (c y d) y en la glándula pituitaria (e y f) en ratones *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* y *autoDrd2KO*.

También se detectó la presencia del D2R mediante ensayos de unión del ligando radiactivo [<sup>3</sup>H]-nemonapride, un antagonista de receptores de "tipo D2". En los ratones *autoDrd2KO* se detecta el D2R en el estriado y en la hipófisis, mientras que está ausente en el cerebro medio (Figura 7a).

Se realizó, además, un ensayo de unión a ligando radiactivo para analizar la expresión de receptores D1 en animales que carecen de autorreceptores. Los resultados obtenidos mostraron que la falta de D2R presinápticos, no altera en forma evidente la distribución y presencia de receptores D1 en los ratones *autoDrd2KO* comparado con sus hermanos *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* (Figura 7b).

De esta manera, se pudo determinar que, efectivamente, estos animales eran auténticos mutantes nulos para la expresión de autorreceptores D2 en las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio.



**Figura 7. Patrones de expresión de receptores dopaminérgicos.** **a.** Ensayo de unión a ligando radiactivo utilizando [<sup>3</sup>H]-nemonapride, un antagonista de receptores tipo D2. **b.** Ensayo de unión a ligando radiactivo utilizando [<sup>3</sup>H]-SCH23390, un antagonista de receptores tipo D1. En **a** y **b** se muestran solamente los paneles correspondientes a los ensayos de unión específicos.

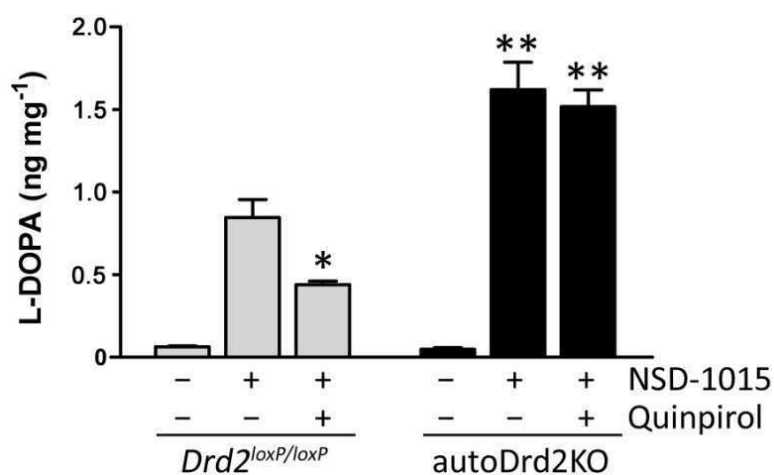
### Liberación y síntesis de dopamina mediadas por autoreceptores D2

En el marco de un trabajo en colaboración con el Dr. David Lovinger y la Dra. Verónica Álvarez del *National Institute for Alcohol Abuse and Alcoholism* (NIAAA), NIH, EEUU, se estudió el efecto de la ausencia de autorreceptores sobre la liberación de dopamina. Para ello, se realizaron experimentos de voltametría cíclica de barrido rápido (FSCV) *ex vivo* y se determinó que los ratones autoDrd2KO liberan más dopamina frente a la estimulación de un pulso eléctrico único (Figura Suplementaria 1 del Apéndice). Este aumento detectado en la liberación de dopamina podría deberse a distintos motivos. Por un lado, a un mayor número de vesículas presinápticas; o bien, a que cada vesícula tenga mayor carga de dopamina, por síntesis alterada de la dopamina. Se ha postulado que la actividad de TH es capaz de aumentar el contenido cuántico de las vesículas a través de la estimulación de D2R presinápticos (Pothos *et al.*, 1998; Kehr *et al.*, 1972). En nuestro caso, por razones técnicas, no fue posible realizar un experimento que permitiera demostrar si había un aumento en la cantidad de vesículas que se liberan por pulso de estimulación.

Para responder el segundo punto, evaluamos la actividad de TH, enzima limitante en el proceso de síntesis de dopamina. La actividad de TH determinó por acumulación de L-3,4-

dihidroxifenilalanina (L-DOPA) en estriados de ratones al administrar NSD-1015, un compuesto inhibidor de la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC), enzima que convierte L-DOPA en dopamina.

La determinación por HPLC de los niveles de L-DOPA por mg de tejido en los autoDrd2KO ( $1621 \pm 368$  pg/ mg de tejido) fue el doble que la observada en los *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* ( $846 \pm 267$  pg/mg de tejido) (Figura 8). Si se administraba previamente quinpirol, un agonista de receptores "tipo D2", en una dosis de 0,5 mg por kg de peso corporal, se observó una disminución de la actividad de TH en ratones *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>*. Esto se debe a que la estimulación del quinpirol sobre los receptores "tipo D2" inhibe la síntesis de dopamina. Esta disminución no se observó en ratones autoDrd2KO, lo que sugiere que el D2R es el único receptor de "tipo D2" que participa en la inhibición de la retroalimentación de la síntesis de dopamina y que esta función no está siendo compensada por receptores D3 ni D4.



**Figura 8. Actividad de la tirosina hidroxilasa.** Se detectó por HPLC la acumulación de L-DOPA en estriados de ratones *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* y autoDrd2KO que recibieron solución salina o NSD-1015 en una dosis de 100 mg por kg. En algunos casos, se administró quinpirol en una dosis de 0.5 mg por kg 30 min antes del NSD-1015. ANOVA de 2 vías. Genotipo:  $F(1,17)=34,84$ ,  $p<0,001$ . Tratamiento:  $F(2,17)=48,15$ ,  $p<0,05$  entre animales tratados con NSD-1015 que reciben o no quinpirol. Interacción:  $F(2,17)=8,58$ ,  $p<0,005$ . Análisis *post hoc* de Fisher. Referencias: \*diferencias significativas con respecto a NSD-1015 solo; \*\*diferencias significativas entre genotipos.

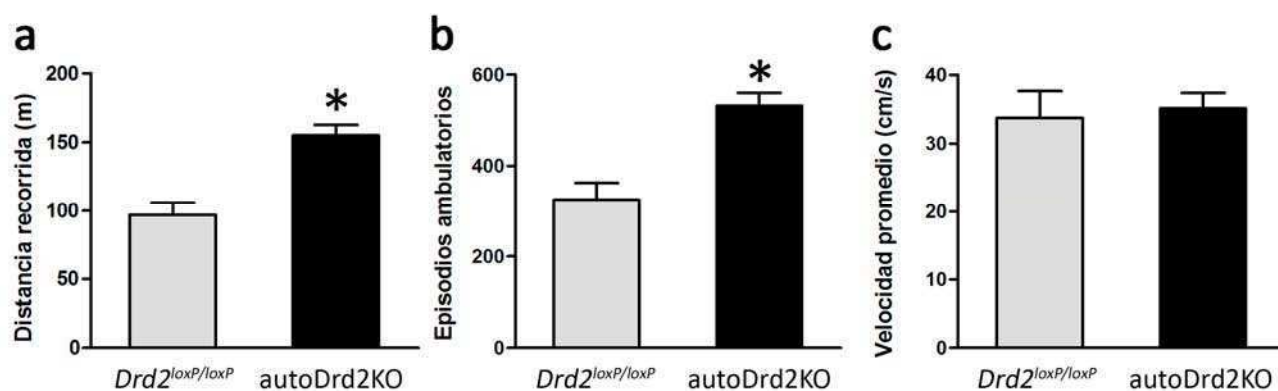
En el mismo experimento fue posible determinar el contenido total de dopamina en el estriado y no se observaron diferencias significativas entre ambos genotipos. El contenido de dopamina estriatal total fue de  $68,2 \pm 10,3$  pmol por mg de tejido para los ratones

$Drd2^{loxP/loxP}$  y de  $64,1 \pm 7,6$  pmol por mg de tejido para los ratones autoDrd2KO.

Para investigar las consecuencias funcionales de la falta de autorreceptores D2 en la regulación de la liberación de dopamina durante la actividad sostenida, en el laboratorio del Dr. Lovinger se hicieron experimentos de FSCV *ex vivo*. Se aplicaron trenes de estimulación de 30 pulsos a 10 Hz (10-min intervalos intra-trenes) en el estriado dorsal y se midió la liberación de dopamina. En el caso de los ratones autoDrd2KO, los trenes de estimulación lograron mantener niveles de dopamina extracelular sostenidos e incluso mayores que los evocados en ratones  $Drd2^{loxP/loxP}$  donde el perfil de liberación muestra el típico pico inicial para luego caer progresivamente. Estos niveles supramáximos de dopamina resultaron insensibles al antagonista de D2R sulpirida (Figura Suplementaria 2 del Apéndice).

### Análisis de la actividad locomotora

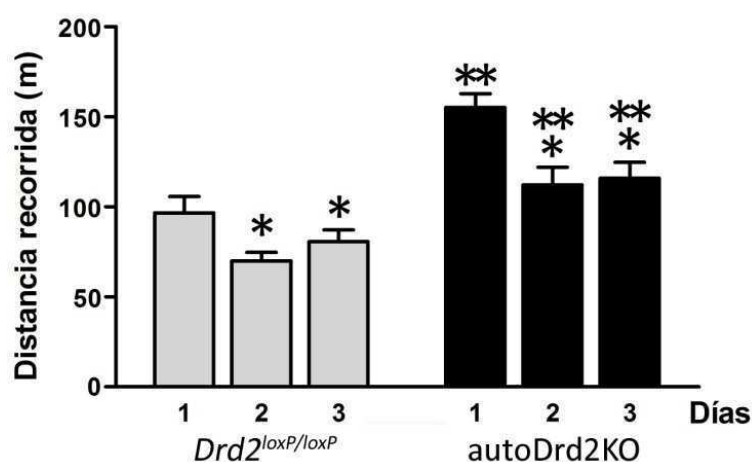
Para evaluar la existencia de posibles correlatos funcionales al aumento en la síntesis y liberación de dopamina, determinamos la actividad locomotora espontánea de los animales autoDrd2KO colocándolos 1 hora durante 3 días consecutivos en cajas de actividad y la comparamos con la actividad de sus hermanos  $Drd2^{loxP/loxP}$ .



**Figura 9. Parámetros locomotores en ratones autoDr2KO y  $Drd2^{loxP/loxP}$ .** Se colocan los ratones en una caja de actividad novedosa durante 60 min mientras se registra la locomoción espontánea **a.** Actividad locomotora espontánea durante 60 min. ANOVA de 1 vía  $F(1,25)=23,26$ ,  $*p<0,0001$ . **b.** Número de veces que inician movimientos. ANOVA de 1 vía.  $F(1,26)=18,79$ ,  $*p<0,001$ . **c.** Velocidad ambulatoria promedio medida en cm/s. ANOVA de 1 vía.  $F(1,26)=0,1$ ,  $p=0,76$ .

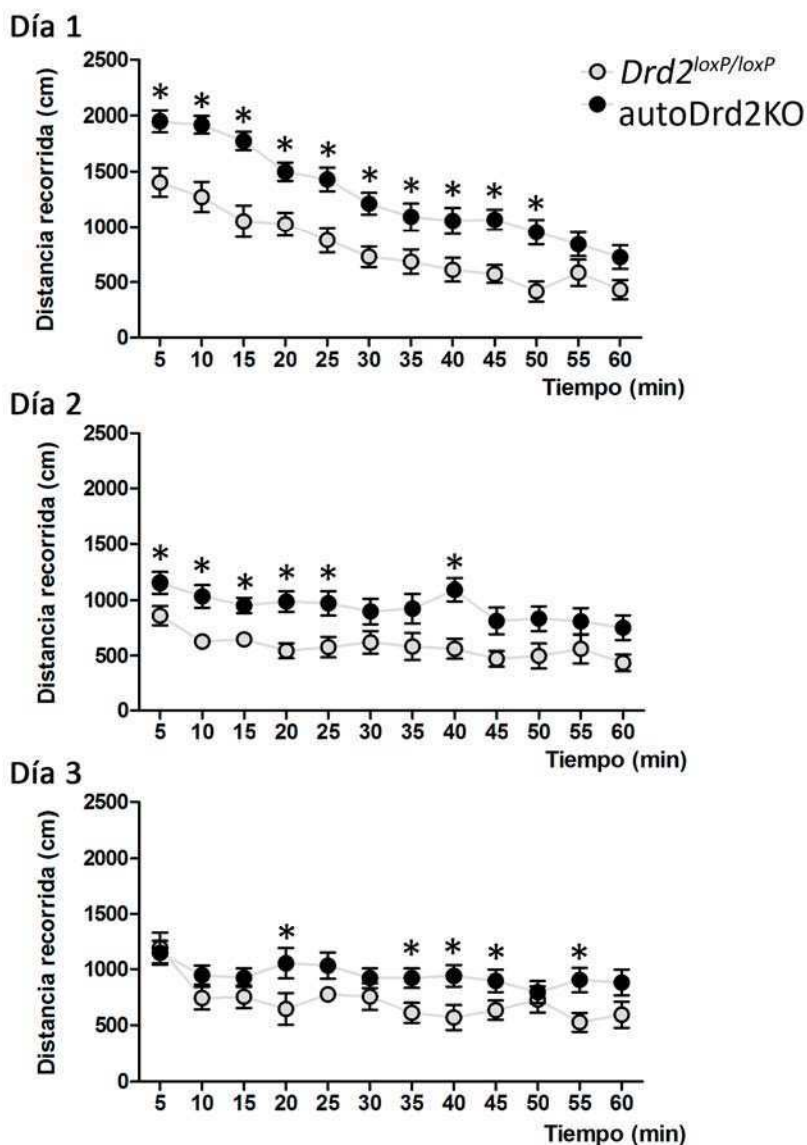


Los ratones autoDrd2KO mostraron una actividad locomotora superior a los controles en un 50 % (Figura 9a). La hiperactividad se debe a una frecuencia más alta en el número de veces que inician el movimiento ( $Drd2^{loxP/loxP}$ ,  $325,0 \pm 39,3$  iniciaciones; autoDrd2KO,  $531,7 \pm 29,7$  iniciaciones), y no a una mayor velocidad ( $Drd2^{loxP/loxP}$ ,  $33,7 \pm 4,1$  cm s<sup>-1</sup>; autoDrd2KO,  $35,0 \pm 2,4$  cm s<sup>-1</sup>) (Figura 9b y c). Cuando evaluamos la habituación, es decir, la locomoción espontánea durante 3 días consecutivos, observamos que los ratones autoDrd2KO mostraron patrones normales comparados con sus hermanos  $Drd2^{loxP/loxP}$  (Figura 10). Sin embargo, las diferencias en los niveles de actividad entre ambos genotipos se mantienen entre el 60 % y 40 % para los 3 días.



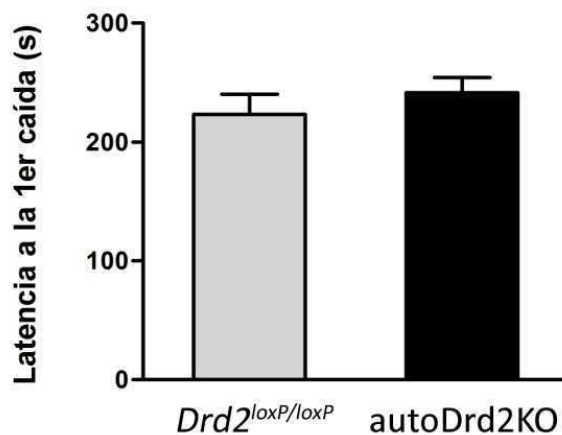
**Figura 10. Locomoción espontánea durante 3 días consecutivos en cajas de actividad.** Se muestran los niveles de actividad espontánea durante 1 hora por 3 días consecutivos. ANOVA de Medidas Repetidas. Genotipo:  $F(1,25)=15,60$ ,  $**p<0.001$  comparado con ratones  $Drd2^{loxP/loxP}$ . Días:  $F(2,50)=28,22$ ,  $*p<0,01$  con respecto al día 1 de cada genotipo. Interacción:  $F(2,50)=2,97$ ,  $p=0,06$ .

Para entender mejor el patrón de actividad de ambos grupos en las cajas de actividad, analizamos la locomoción para cada día de habituación. Los resultados muestran que los ratones autoDr2KO son hiperactivos respecto a los controles durante casi todo el primer día, mientras que, en los días sucesivos, esa diferencia va disminuyendo (Figura 11). De todas maneras, la hiperactividad total durante los 60 minutos se mantiene.



**Figura 11. Habituaación durante 30 min.** Se muestra la locomoción espontánea en cada uno de los días de habituación graficada en intervalos de tiempo cada 5 min. ANOVA de Medidas Repetidas para cada día. **Día 1:** Genotipo:  $F(1,25)=23,26$ ,  $p<0,0001$ ; Tiempo:  $F(11,275)=34,45$ ,  $p<0,0001$ ; Interacción:  $F(11,275)=1,11$ ,  $p=0,35$ . **Día 2:** Genotipo:  $F(1,25)=9,78$ ,  $p<0,01$ ; Tiempo:  $F(11,275)=3,50$ ,  $p<0,001$ ; Interacción:  $F(11,275)=0,47$ ,  $p=0,92$ . **Día 3:** Genotipo:  $F(1,25)=5,64$ ,  $p<0,05$ ; Tiempo:  $F(11,275)=6,25$ ,  $p<0,0001$ ; Interacción:  $F(11,275)=2,56$ ,  $p<0,01$ . Referencias: \*diferencias significativas en un análisis de ANOVA de 1 vía realizado punto a punto porque no se encontraron diferencias utilizando ANOVA de Medidas Repetidas.

Con la finalidad de evaluar las habilidades de coordinación locomotora de los animales, se utilizó un test del rodillo móvil (*rotarod*), tanto en programas de velocidad fija (datos no mostrados) como acelerada y no se observaron diferencias entre los ratones autoDrd2KO y los *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* (Figura 12).

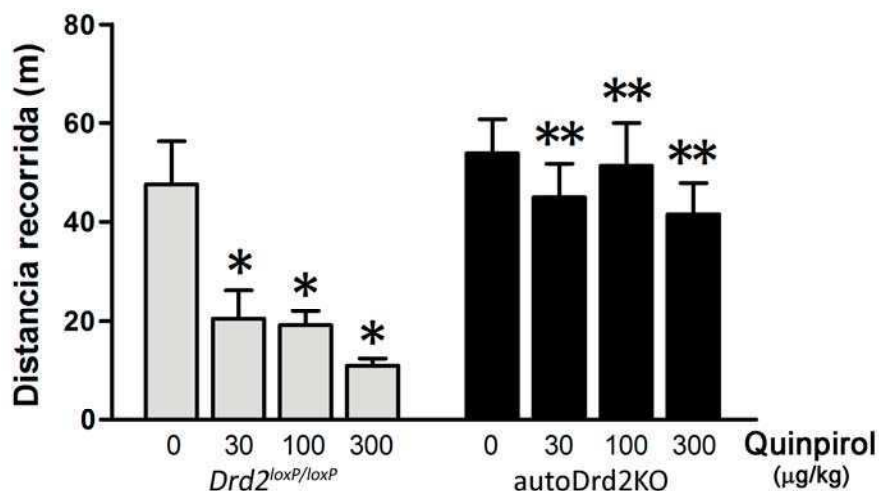


**Figura 12. Coordinación motora sobre el rotarod.** Ratones de ambos genotipos fueron entrenados durante 3 días en un esquema de velocidad fija de 16 rpm. Luego se evaluaron en un programa de velocidad acelerada 4 – 40 rpm y se muestran la latencia a la primera caída. ANOVA de 1 vía.  $F(1,11)=0,75$ ,  $p=0,40$ .

### **Funcionalidad de los autoreceptores *in vivo***

Para medir los efectos de la falta de autorreceptores D2, se realizó una curva dosis – respuesta al quinpirol, un agonista “tipo D2”. Como la proporción de receptores postsinápticos es superior a la de presinápticos (Montmayeur *et al.*, 1991), se espera que dosis bajas de agonista sólo tengan un efecto neto sobre la presinapsis (Di Chiara *et al.*, 1976; Eilam y Szechtman, 1989).

Los resultados muestran que dosis bajas de quinpirol disminuyen la actividad locomotora de los ratones *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>*, pero no de los ratones autoDrd2KO (Figura 13). La falta de acción del quinpirol sobre los autoDrd2KO permitiría inferir que la estimulación de los autorreceptores D2 sería la responsable de la disminución en la actividad locomotora, probablemente mediante la reducción de disparo de las neuronas dopaminérgicas y la liberación de dopamina (Eilam y Szechtman, 1989).



**Figura 13. Actividad locomotora en respuesta al quinpirol.** Ratones de ambos genotipos se inyectan con solución salina o distintas dosis de quinpirol (0.03, 0.1 o 0.3 mg/kg de peso). Después de 30 min se colocan en cajas de actividad y se registra la locomoción durante 30 min. ANOVA de 2 vías. Tratamiento:  $F(1,45)=15,18$ ,  $p<0,001$ . Genotipo:  $F(1,67)=17,00$ ,  $p<0,001$ . Referencias \*diferencias significativas con respecto a 0 µg/kg; \*\*diferencias significativas con respecto a los ratones *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>*.

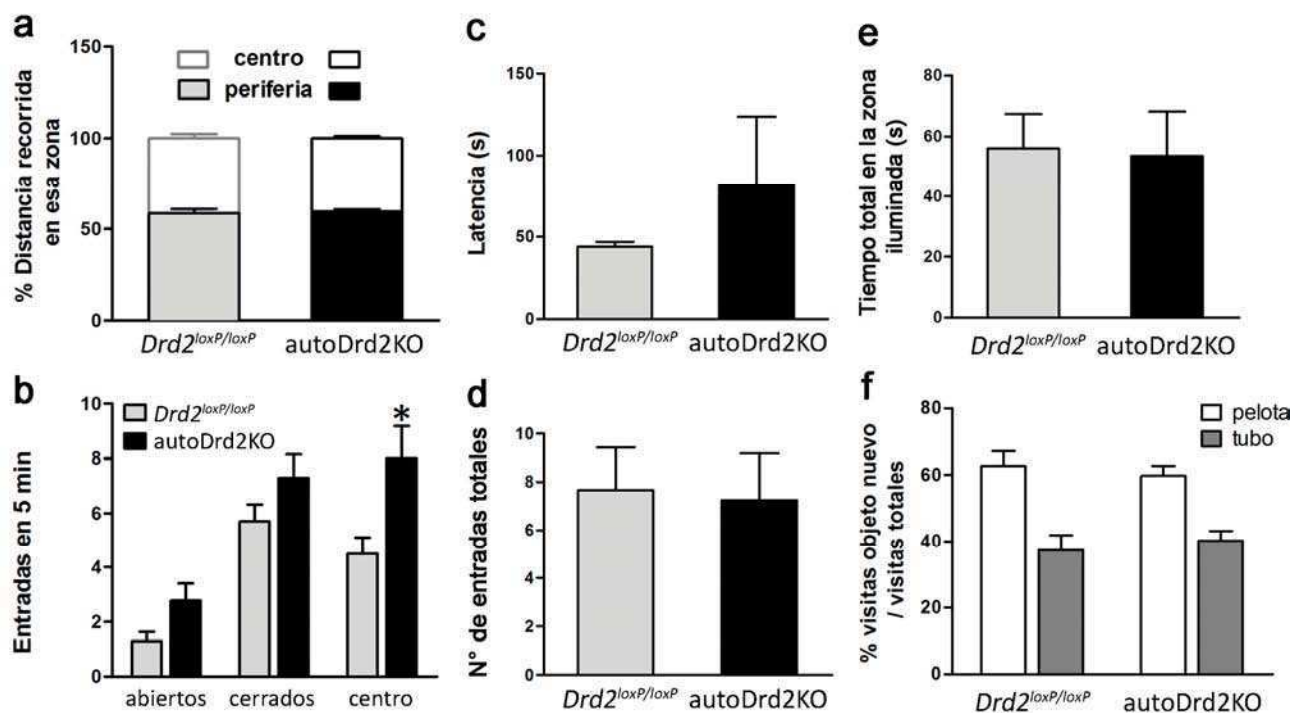
Además, en el laboratorio de la Dra. Verónica Álvarez, se realizaron mediciones de las corrientes de neuronas dopaminérgicas del cerebro medio en condiciones de clampeo de voltaje. Se observó la ausencia de respuesta en células de ratones autoDrd2KO a la acción moduladora de agonistas y antagonistas de "tipo D2" en las corrientes inhibitorias postsinápticas de neuronas dopaminérgicas del cerebro medio (Figura Suplementaria 3 del Apéndice). Esto confirma el papel de los D2R como autorreceptores que modulan las corrientes iónicas en las neuronas dopaminérgicas.

### Conductas relacionadas con conflictos de aproximación/evitación

Debido a que varios modelos de ratones con alteraciones genéticas que resultaron hiperactivos mostraron alteraciones en conductas de evaluación de riesgo o conflicto (Avale *et al.*, 2004; Giros *et al.*, 1996; Zhuang *et al.*, 2001), decidimos estudiar la conducta de los ratones autoDrd2KO en diversas situaciones y paradigmas donde se presentan conflictos de aproximación/evitación.

En primer lugar, analizamos la locomoción durante el primer día de habituación en las cajas de actividad discriminando la actividad según el área. Normalmente, los ratones tienden a caminar cerca de las paredes de la caja evitando el centro por ser una zona más

desprotegida (Simon *et al.*, 1994; File, 2001). El análisis de los registros realizados demostraron que los ratones autoDrd2KO evitaron el área central de la arena en igual medida que sus hermanos *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* (Figura 14a).



**Figura 14. Parámetros en tests de conflictos de aproximación/evitación.** **a.** Análisis de la locomoción espontánea del primer día de habituación diferenciado por zona. Se registró el porcentaje de la actividad locomotora correspondiente al área central (centro) y en las áreas periféricas (periferia) de la caja de actividad. ANOVA de 1 vía.  $F(1,27)=0,17$ ,  $p=0,68$ . **b.** Número de entradas a las distintas zonas de un laberinto en cruz elevado. Se midió la cantidad de veces que los ratones entran en brazos abiertos (sin paredes), cerrados (con paredes) o que pasaron por el centro en 5 min. ANOVA de 1 vía. Brazos abiertos:  $F(1,25)=2,83$ ,  $p=0,10$ . Brazos cerrados:  $F(1,25)=1,72$ ,  $p=0,20$ . Centro:  $F(1,25)=4,65$ ,  $*p<0,05$ . **(c-e)** Ratones de ambos genotipos se evaluaron en un test de luz/oscuridad. **c.** Se colocaron primero en la zona oscura y se registró la latencia a la primera salida a la zona iluminada. ANOVA de 1 vía.  $F(1,6)=1,26$ ,  $p=0,30$ . **d.** Número de entradas totales a la zona iluminada durante los 5 min del test. ANOVA de 1 vía.  $F(1,6)=1,26$ ,  $p=0,33$ . **e.** Tiempo total que los ratones permanecieron en la zona iluminada. ANOVA de 1 vía.  $F(1,6)=0,28$ ,  $p=0,61$ . **f.** Test del objeto novedoso. Se determinó el porcentaje de visitas al objeto nuevo (pelota) y al objeto conocido (tubo) con respecto al total de visitas realizadas. ANOVA Medidas Repetidas. Reconocimiento:  $F(1,22)=17,52$ ,  $p<0,001$ . ANOVA de 1 vía. Genotipo:  $F(1,22)=0,29$ ,  $p=0,59$ .

Se sabe que el comportamiento normal de ratones wt en un laberinto en cruz elevado es evitar la entrada en los brazos abiertos (Walf y Frye, 2007); por lo tanto, evaluamos el

comportamiento de nuestros ratones en este paradigma durante 5 min. Los resultados mostraron que ratones de ambos genotipos evitaron entrar en los brazos abiertos en forma similar (Figura 14b). No obstante, observamos un aumento significativo de la cantidad de veces que los ratones autoDrd2KO pasan por el centro para alternar entre brazos (Figura 14b); ésto podría deberse a su hiperactividad (Pellow *et al.*, 1985; File, 2001; Schwarting y Borta, 2005).

Un test de luz/oscuridad normalmente detecta diferencias en conductas relacionadas con niveles de ansiedad alterados realizado durante 5 min que, no se observaron diferencias entre los ratones autoDrd2KO y los *Drd2*<sup>loxP/loxP</sup> al medir la latencia (tiempo que tardan en entrar por primera vez al espacio iluminado), el tiempo (que pasaron en el compartimento iluminado) y la cantidad de veces que entraron en el compartimento iluminado (Figura 14c-e).

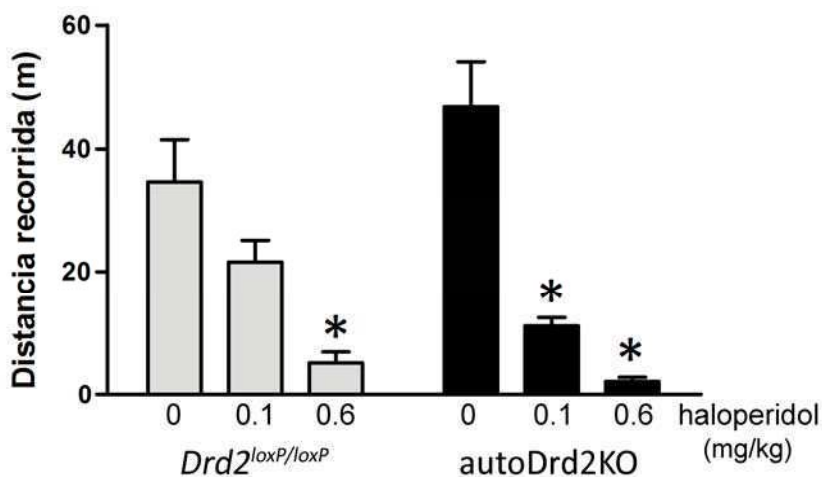
Finalmente, las reacciones ante un objeto novedoso entre ratones autoDrd2KO y *Drd2*<sup>loxP/loxP</sup> mostraron que los porcentaje de visitas a un objeto conocido y uno nuevo son similares (Figura 14f).

En conjunto, el análisis de estos resultados indica que de este nuevo modelo de ratones que carecen de autorreceptores dopaminérgicos D2 no muestran diferencias en ninguno de los paradigmas que evalúan la conducta en conflictos de acercamiento/evitación.

### **Efecto del haloperidol**

El haloperidol es un antagonista de receptores “tipo D2”. Para evaluar el efecto de esta droga administramos dosis de 0,1 ó 0,6 mg/kg de haloperidol a ratones de ambos genotipos.

Observamos que una dosis de 0,1 mg/kg de haloperidol redujo la actividad locomotora de los ratones *Drd2*<sup>loxP/loxP</sup> y autoDrd2KO en un 38 % y 76 %, respectivamente (Figura 15); mientras que una dosis de 0,6 mg/kg de haloperidol redujo la actividad locomotora en un 85 % en ratones *Drd2*<sup>loxP/loxP</sup>, los ratones autoDrd2KO permanecieron prácticamente aquinéticos. Estos resultados muestran que ratones autoDrd2KO resultaron supersensibles a la acción del haloperidol.



**Figura 14. Locomoción es respuesta al haloperidol.** Ratones de ambos genotipos fueron inyectados con solución salina o distintas dosis de haloperidol (0.1 y 0.6 mg/kg de peso). Luego de 20 min se colocaron los ratones en una caja de actividad donde se registró su actividad locomotora durante 30 min. ANOVA de 2 vías. Genotipo:  $F(1, 17)=0,24$ ,  $p=0,63$ . Tratamiento:  $F(2,17)=21,71$ ,  $p<0,001$ . Interacción:  $F(2,17)=2,16$ ,  $p=0,15$ . Análisis *post hoc* de Fisher. Referencias: \*diferencias significativas del tratamiento con respecto a salina para ese genotipo.

### Funcionalidad del DAT

El DAT y los autorreceptores D2 comparten la tarea de limitar los niveles extracelulares de dopamina a través de su rápida recaptación y de la inhibición de la actividad neuronal y la liberación de dopamina, respectivamente (Kennedy *et al.*, 1992; Dickinson *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 1999). Se ha postulado repetidas veces que existe una interacción entre el D2R y el DAT (Dickinson *et al.*, 1999; Schmitz *et al.*, 2002, Wu *et al.*, 2002).

Para examinar posibles alteraciones en la cinética de recaptación del DAT en ausencia de autorreceptores D2, realizamos una serie de experimentos en colaboración con el laboratorio del Dr. Lovinger (NIAAA, NIH, EEUU). Utilizando la técnica de voltimetría cíclica de barrido rápido (FSCV) se dieron pulsos simples de estimulación en cortes de cerebro a nivel del estriado dorsal de ratones autoDrd2KO y *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* y se detectó la liberación de dopamina en presencia de solución salina, cocaína y metilfenidato (inhibidores del DAT). Se determinaron los perfiles de recaptación de dopamina en los 3 casos comparando las constantes de decaimiento ( $\tau$ ) para el DAT (Figura Suplementaria 4 del Apéndice).

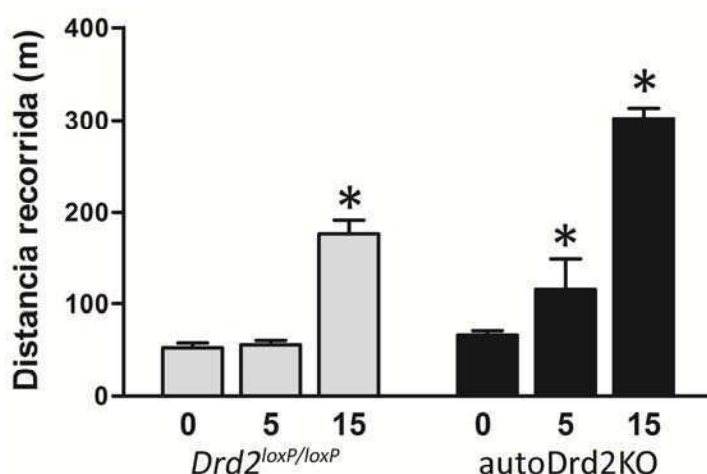
La cocaína (10  $\mu\text{M}$ ) aumentó la liberación de dopamina evocada por estimulación en forma similar en ambos genotipos, al igual que el metilfenidato; es decir, que ambos inhibidores disminuyeron la recaptación de dopamina en forma similar en ratones autoDrd2 y

$Drd2^{loxP/loxP}$  (observado a través de un aumento en  $\tau$ ). Por lo tanto, la recaptación mediada por DAT permanece normal a pesar de la ausencia total de autorreceptores D2 en ratones autoDrd2KO.

### Sensibilidad a la cocaína

Para estudiar posibles alteraciones en respuestas a agonistas dopaminérgicos, estudiamos la respuesta *in vivo* a cocaína. Para ello, administramos solución salina o distintas dosis de cocaína (5 y 15 mg/kg) a ratones autoDrd2KO y  $Drd2^{loxP/loxP}$  que inmediatamente después se colocaron en cajas de actividad donde se registró la locomoción de cada ratón durante 30 min.

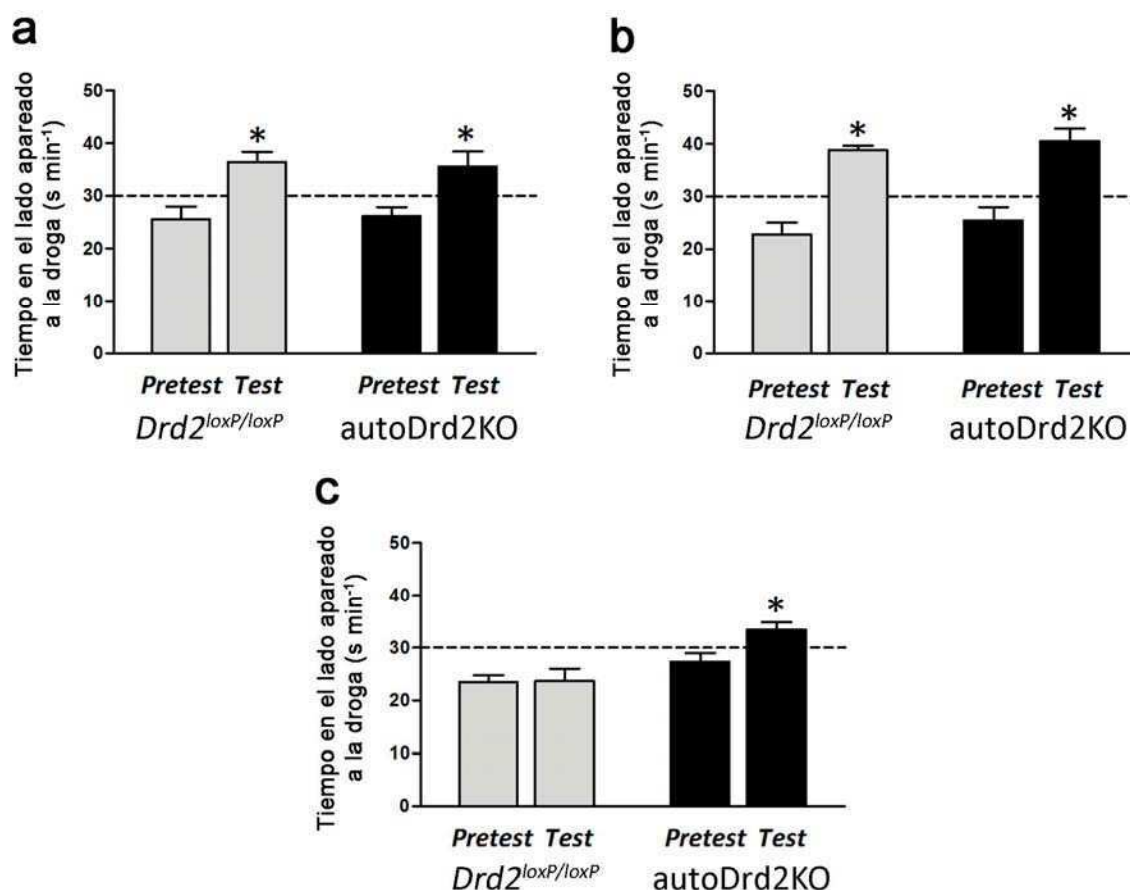
A una dosis de 5 mg/kg, la cocaína incrementó la actividad locomotora de los ratones autoDrd2KO 1,4 veces y no tuvo ningún efecto en ratones  $Drd2^{loxP/loxP}$ , mientras que a una dosis de 15 mg/kg, la cocaína aumentó la actividad locomotora de los ratones  $Drd2^{loxP/loxP}$  y autoDrd2KO en 2,8 y 3,8 veces, respectivamente (Figura 16). Estos resultados indicarían que los ratones autoDrd2KO resultaron supersensibles a los efectos estimulantes locomotores de la cocaína.



**Figura 16. Locomoción en respuesta a cocaína.** Ratones  $Drd2^{loxP/loxP}$  y autoDrd2KO se inyectaron con distintas dosis de cocaína o vehículo, e inmediatamente se registró la actividad locomotora por 30 min en una caja de actividad. ANOVA de 2 vías. Tratamiento:  $F(2,39)=88.91$ ,  $p<0.001$ . Genotipo:  $F(1,39)=34.23$ ,  $p<0.001$ . Interacción:  $F(2,39)=7.22$ ,  $p<0.05$ . Análisis *post hoc* de Fisher. Referencias \*diferencias significativas con respecto a salina; \*\*diferencias significativas con respecto a ratones  $Drd2^{loxP/loxP}$ .



Con la idea de estudiar si esta mayor sensibilidad observada en animales autoDrd2KO se reflejaba también en un aumento de la sensibilidad a las propiedades reforzantes de la cocaína, decidimos hacer un test de condicionamiento por preferencia de lugar (CPP, Cunningham *et al.*, 2006). Este test mide la preferencia inicial y final por una zona determinada (un tipo de piso particular) en la que los ratones recibieron cocaína (dos dosis de 0.5 y 5 mg/kg) durante un tiempo variable de condicionamiento (4 u 8 sesiones).



**Figura 17. Condicionamiento por preferencia de lugar (CPP) con cocaína.** Se realizaron distintos ensayos de CPP utilizando distintas dosis de cocaína y distinta cantidad de sesiones de condicionamiento. Se graficó el promedio para cada genotipo del tiempo total (en segundos, s) que pasan en el lado asociado a la droga dividido por el tiempo total del ensayo (30 min) antes (*Pretest*) y después (*Test*) del condicionamiento con cocaína. La línea punteada indica el 50 % del tiempo (s) por min. Los resultados se analizaron con ANOVA de Medidas Repetidas. **a.** CPP de 8 sesiones de condicionamiento utilizando una dosis de cocaína de 5 mg/kg. Genotipo:  $F(1,14)=0,004$ ,  $p=0,95$ . Condicionamiento:  $F(1,14)=24,19$ ,  $p<0,001$ . Interacción:  $F(1,14)=0,13$ ,  $p=0,72$ . **b.** CPP de 4 sesiones de condicionamiento utilizando una dosis de cocaína de 5 mg/kg. *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* (n=4); autoDrd2KO (n=4). Genotipo:  $F(1,6)=0,76$ ,  $p=0,42$ . Condicionamiento:  $F(1,6)=93,05$ ,  $p<0,001$ . Interacción:  $F(1,6)=0,10$ ,  $p=0,76$ . **c.** CPP de 4 sesiones de condicionamiento utilizando una dosis de cocaína de 0.5 mg/kg. *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* (n=6); autoDrd2KO (n=6). Genotipo:  $F(1,10)=13,18$ ,  $p<0,05$ . Condicionamiento:  $F(1,10)=3,94$ ,  $p=0,08$ . Interacción:  $F(1,10)=3,49$ ,  $p=0,09$ . Análisis *post hoc* de Fisher. Referencias \*diferencias significativas entre el test y el pretest para un mismo genotipo.

Observamos que a una dosis de 5 mg/kg, la cocaína induce respuestas condicionadas en ratones de ambos genotipos tanto con 8 como con 4 sesiones de condicionamiento (Figura 17a-b) ya que aumenta el tiempo que los animales pasan en el compartimento donde recibieron la droga durante el condicionamiento. Sin embargo, cuando se utilizó una dosis 10 veces menor de cocaína (0,5 mg/kg) y 4 sesiones de condicionamiento, solamente los ratones autoDrd2KO mostraron respuestas condicionadas significativas (Figura 17c). Estos resultados indican que la sensibilidad por la recompensa mediada por cocaína aumenta en ausencia de autorreceptores D2.

### **Sensibilización a la cocaína**

La exposición repetida a cocaína produce sensibilización conductual (ver Introducción general) y las diferencias encontradas en los experimentos de CPP podrían estar reflejando diferencias en los procesos que subyacen el desarrollo y la expresión de esta sensibilización en ratones que carecen de autorreceptores D2.

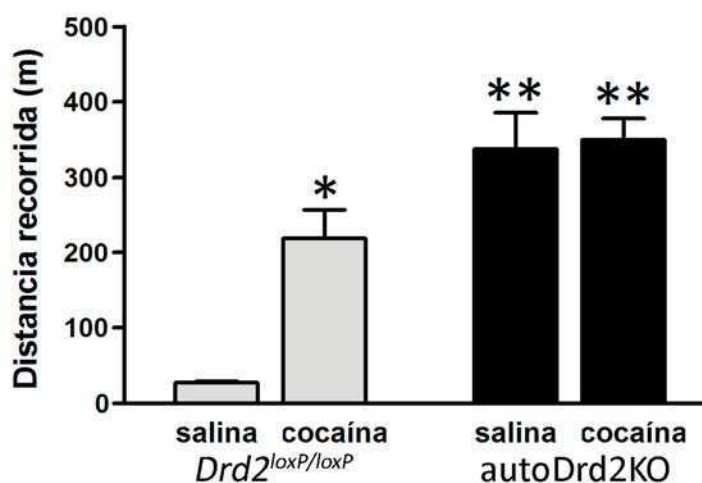
Para su estudio, decidimos realizar un protocolo de sensibilización administrando dosis diarias de 10 mg/kg de cocaína o salina en ratones de ambos genotipos durante 4 días consecutivos. Luego de cada inyección, los ratones se colocaron en cajas de actividad donde se registró su locomoción durante 30 min. Una semana más tarde, todos los animales recibieron cocaína (sin importar que hayan sido tratados previamente con salina o cocaína) y evaluamos nuevamente la actividad locomotora en las mismas cajas durante 30 min y los resultados se grafican en la Figura 18.

Observamos que los ratones *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* expuestos a cocaína previamente mostraron un marcado aumento de la actividad locomotora si se comparan con ratones que reciben cocaína por primera vez (Figura 18). No obstante, los ratones autoDrd2KO tratados con cocaína mostraron niveles de actividad similares a los ratones del mismo genotipo no expuestos previamente a la droga. El aumento en la actividad de ratones *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* expuestos a repetidas dosis de cocaína fue de  $8,4 \pm 3,8$  veces, mientras que, en el caso de ratones autoDrd2KO, esta relación fue de  $1,1 \pm 0,3$  veces.

El análisis comparado de estos resultados indica que los ratones *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* sensibilizaron con esta dosis de cocaína, mientras que los ratones autoDrd2KO no (Figura 18) ya que la

actividad observada con o sin exposición previa a la droga en estos últimos es similar.

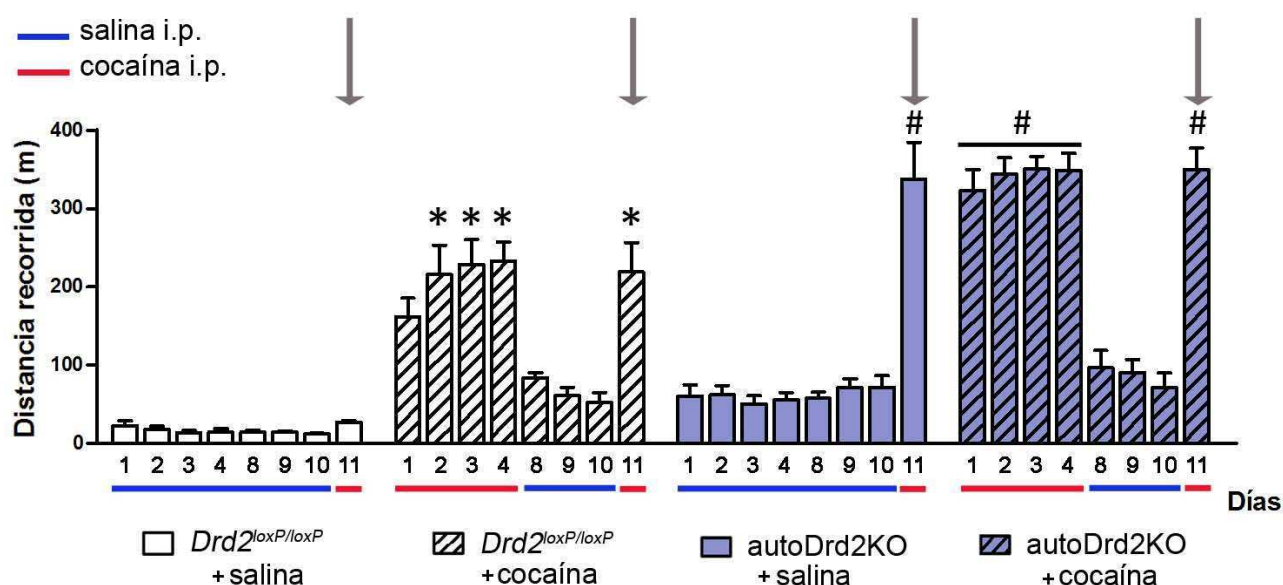
Podríamos interpretar la ausencia de aumento en la respuesta locomotora al tratamiento repetido en ratones *autoDrd2KO* como una falta de sensibilización a la cocaína. Sin embargo, dada la gran respuesta que muestran frente a una única administración de cocaína y a la supersensibilidad observada frente a sus propiedades reforzantes en el CPP, podríamos pensar que estamos enmascarando de alguna manera la expresión de la sensibilización. La posible falta en la expresión de la sensibilización podría deberse a (i) que la dosis utilizada es muy alta y por lo tanto, los niveles de actividad alcanzados son máximos y no pueden superarse con exposiciones repetidas a la droga, o a (ii) que estos animales, al tener aumentada la liberación de dopamina en forma crónica, ya están sensibilizados antes de exponerse a la droga por primera vez.



**Figura 18. Sensibilización a la administración repetida de cocaína.** Ratones de ambos genotipos se inyectan cuatro días consecutivos con 10 mg/kg de cocaína o salina y se colocan inmediatamente en una caja de actividad donde se registra su locomoción durante 30 min. Una semana más tarde, todos se inyectan con 10 mg/kg de cocaína hayan recibido antes la droga o no, y se colocan en la misma caja de actividad donde se registra nuevamente la actividad locomotora. Los datos correspondientes a este último día son los que se representan en esta figura. ANOVA de 2 vías. Genotipo:  $F(1,12)=44,52$ ,  $p<0,0001$ ; Tratamiento:  $F(1,12)=9,46$ ,  $p<0,01$ ; Interacción:  $F(1,12)=7,33$ ,  $p<0,05$ . Análisis *post hoc* de Fisher. Referencias: \*diferencias significativas cocaína vs salina dentro de un grupo; \*\*diferencias significativas entre genotipos.

Como ya observamos, ratones *autoDrd2KO* presentan una actividad locomotora espontánea superior en un 40-60 % con respecto a ratones control (Figura 10), pero la administración aguda de cocaína en este protocolo particular acentúa esta diferencia a

12,4 veces, una diferencia muy superior a la relación observada para los valores obtenidos en la Figura 16. Esto estaría indicando que la exposición repetida al ambiente previo a la primera administración de cocaína, genera una especie de tolerancia en ratones control, de manera que la cocaína tiene menos efecto que en ratones autoDrd2KO, en los que no parece ocurrir este fenómeno. De hecho, si analizamos la actividad locomotora día por día durante el ensayo de sensibilización a cocaína (Figura 19), observamos que los ratones *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* tratados siempre con salina que reciben cocaína el día 11 alcanzan una locomoción muy inferior a la que alcanzan ratones del mismo genotipo en la primera exposición a cocaína si ésta se da el día 1 del experimento.



**Figura 19. Actividad locomotora en función de la sensibilización a cocaína.** Se muestra la actividad locomotora registrada para cada uno de los grupos a lo largo de los días durante el protocolo de sensibilización a 10 mg/kg a cocaína luego de ser inyectados y colocados en cajas de actividad por 30 min. Los días 1-4 se administró salina/cocaína según correspondía. Los días 8-10 se administró salina. El día 11 se administró cocaína (flechas). ANOVA de Medidas Repetidas. Genotipo:  $F(1,12)=35,16$ ,  $p<0,0001$ ; Tratamiento:  $F(1,12)=103,25$ ,  $p<0,0001$ ; Días:  $F(7,84)=79,72$ ,  $p<0,001$ ; Interacción:  $F(7,84)=11,89$ ,  $p<0,0001$ . Análisis *post hoc* de Fisher. Referencias: \* diferencias significativas con respecto al día 1 en ratones *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* tratados con cocaína; #diferencias significativas con respecto al día 1 de ratones autoDrd2KO tratados con salina.

En ratones *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* que reciben repetidas inyecciones de cocaína, es posible ver un aumento en la locomoción cuando se compara el día 11 contra el primer día en que reciben la droga (día 1). El aumento observado ya se evidencia en la segunda administración de cocaína y no se incrementa luego de la interrupción en la administración

por una semana; lo que estaría evidenciando la sensibilización en ratones *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>*. En los ratones autoDrd2KO tratados repetidas veces con cocaína no se observó esta diferencia entre el día 1 y el día 2; los niveles de locomoción del día 1 son los mismos que el día 11 y son, incluso, similares al día 11 de ratones autoDrd2KO tratados con salina.

Para confirmar que ratones autoDrd2KO están pre-sensibilizados, podría repetirse el experimento utilizando dosis más bajas. Si consideramos que los ratones autoDrd2KO expuestos por primera vez a cocaína mostraron niveles de locomoción muy altos (Figura 18), que superan ampliamente los valores alcanzados por ratones *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* en la misma condición, podríamos inferir que estos ratones con niveles altos de liberación de dopamina ya están sensibilizados.

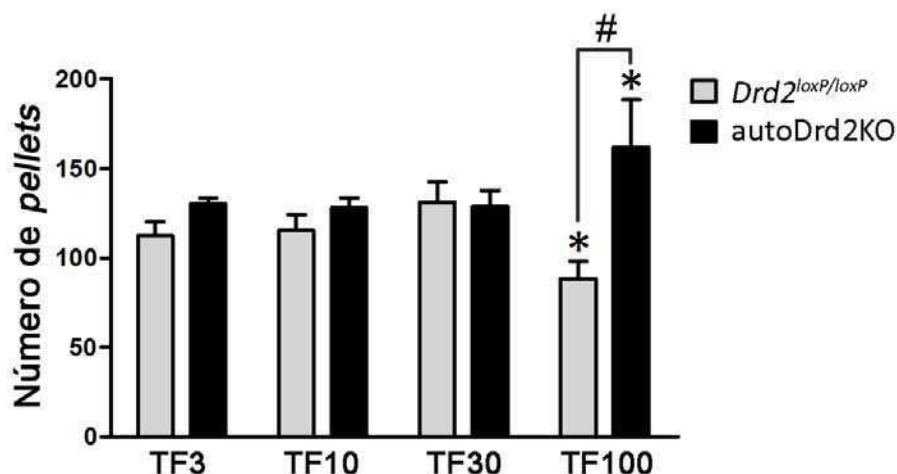
### **Motivación para trabajar por la comida**

Luego de observar alteraciones en la respuesta a drogas como la cocaína, nos resultó de interés estudiar si también podría estar alterada la respuesta a refuerzos naturales, como la comida. Dado que la dopamina participa en el comportamiento guiado por la recompensa (Schultz, 2010; Berridge, 2007; Salamone y Correa, 2002), investigamos si la pérdida de autorreceptores D2 modifica los niveles motivacionales en experimentos de conductas operantes para la obtención de comida.

Para ello, ratones de ambos genotipos fueron mantenidos al 85% de su peso mediante acceso restringido a la alimentación en la jaula y luego entrenados en un esquema de refuerzo continuo con tasas fijas incrementales en cámaras operantes (Med Associates), tal como se detalla a continuación. Los ratones debían presionar un número fijo de veces una palanca para obtener un *pellet* (bolita) de alimento balanceado normocalórico de 20 mg (Med Associates). Ese número fijo de veces se incrementó cada tres días desde 3 hasta 100, pasando por TF3, TF10, TF30 y TF100 (TF por tasa fija).

Observamos que hasta TF30, los ratones de ambos genotipos trabajaron de manera similar para obtener aproximadamente 120 *pellets* de alimento balanceado por sesión y no mostraron diferencias en la saciedad ni en la motivación durante la obtención de comida (Figura 20). Sin embargo, en TF100, los ratones *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* disminuyeron el número de *pellets* obtenidos (abandonando después de presionar  $2,8 \pm 0,3$  horas), mientras que los

ratones autoDrd2KO continuaron presionando la palanca asociada a la recompensa por más de  $4,4 \pm 0,8$  horas, obteniendo un número de *pellets* superior, incluso, a los obtenidos en esquemas de tasas más bajas.

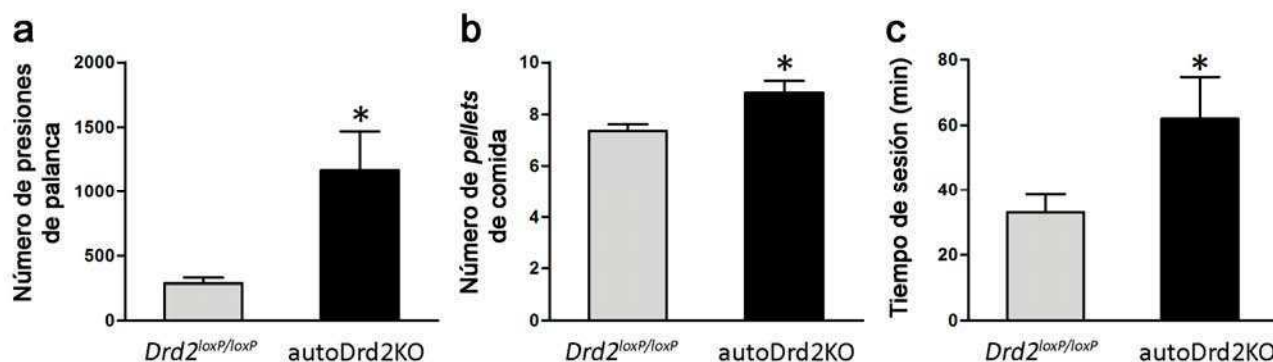


**Figura 20. Esquemas operantes de refuerzo continuo.** Ratones de ambos genotipos se sometieron a esquema de condicionamiento operante en el que aprenden a presionar una palanca un número fijo de veces (tasa fija o TF) a cambio cada *pellet* de comida. Se entrenan en un esquema de TF1 por 5 días. Luego, se someten a esquemas de autoadministración de comida con tasas fijas crecientes TF3, TF10, TF30 y TF100 por 3 días cada uno, excepto TF100 que se realizó una sola vez. Se grafica la cantidad de pellets promedio conseguidos en 3 sesiones para cada TF. ANOVA de Medidas Repetidas. Genotipo:  $F(1,11)=4,92$ ,  $p<0,05$ . Tasa:  $F(3,33)=0,26$ ,  $p=0,86$ . Interacción:  $F(3,33)=4,35$ ,  $p<0,05$ . Análisis *post hoc* de Fisher. Referencias \* $p<0,05$  diferencias significativas con respecto a TF30 para ese genotipo; # $p<0,01$  diferencias significativas entre genotipos.

Para poder determinar si el número mayor de *pellets* obtenidos por los autoDrd2KO en TF100 se debía a su hiperactividad o a una mayor motivación por la comida, decidimos realizar un protocolo de tasa progresiva (o TP). En este esquema de trabajo, los animales debían presionar la palanca un número variable de veces que aumentaba exponencialmente como  $2^n$ ; de manera que dentro de la misma sesión para obtener el primer *pellet* debían presionar 2 veces, para el segundo 4 veces, para el tercero 8 y así, sucesivamente.

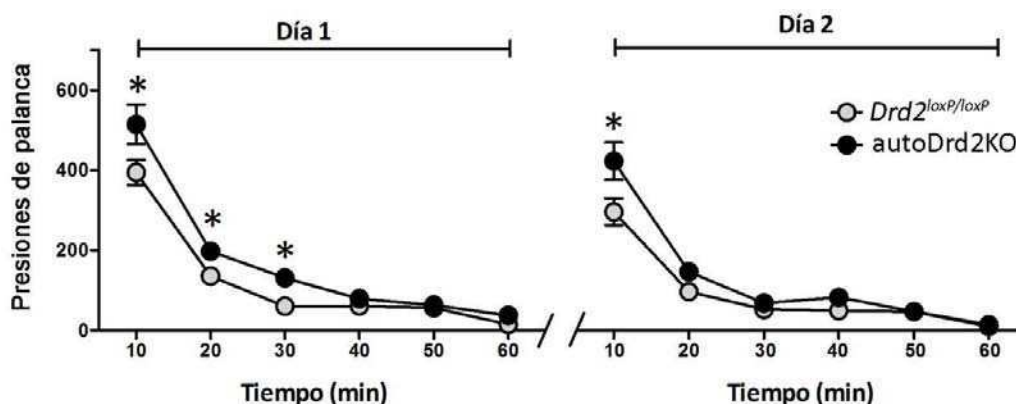
Observamos que los ratones autoDrd2KO presionaron un número de veces mayor comparados con sus hermanos *Drd2*<sup>loxP/loxP</sup> (Figura 21a) obteniendo así, un mayor número de *pellets* (Figura 21b). El tiempo promedio por sesión dedicado a la obtención de alimento fue superior en los ratones autoDrd2KO (Figura 21c). Estos resultados

evidenciaron que los autoDrd2KO muestran mayor motivación para trabajar por la comida.



**Figura 21. Motivación para trabajar por la comida.** Ratones de ambos genotipos se someten a un esquema de tasa progresiva exponencial ( $2^n$ ) durante 3 semanas. Se grafican los promedios para los últimos 5 días. **a.** Número de presiones de palanca promedio por sesión. ANOVA de 1 vía.  $F(1,14)=6.37$ ,  $*p<0.01$ . **b.** Número máximo de *pellets* promedio conseguidos por sesión (*breaking point*). ANOVA de 1 vía.  $F(1,14)=8.94$ ,  $*p<0.05$ . **c.** Tiempo promedio de las sesiones. ANOVA de 1 vía.  $F(1,14)=4.9554$ ,  $*p<0.05$ .

Para investigar si este aumento en el número de presiones realizadas observado para los autoDrd2KO se debía a la hiperactividad motora de estos ratones, realizamos un protocolo de extinción con el objetivo de desaparecer la entrega de la recompensa de la presión de la palanca.



**Figura 22. Respuestas durante dos días de extinción consecutivos.** Los ratones entran a las cámaras operantes que ya no entregan recompensas frente a la presión de palanca. Se muestra el número de presiones realizadas en intervalos de 10 min durante 60 min de extinción. ANOVA de Medidas Repetidas. Genotipo:  $F(1,14)=24.54$ ,  $p<0.001$ ; Tiempo:  $F(11,154)=97.77$ ,  $p<0.0001$ ; Interacción:  $F(11,154)=2.23$ ,  $p<0.05$ . \*diferencias significativas entre genotipos para ese intervalo de tiempo.

En este esquema de extinción donde presionar la palanca ya no resulta en la entrega de

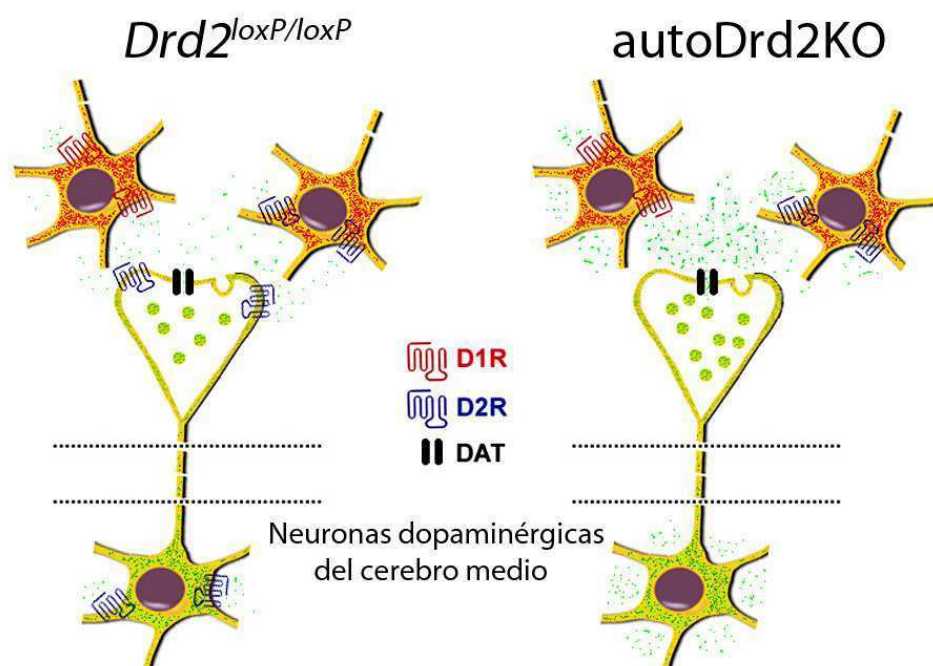
recompensas, ratones de ambos genotipos mostraron perfiles similares, llegando a un número casi nulo de presiones al final de cada sesión (Figura 22). Estos resultados indican que el aumento de la respuesta operante observada en ratones autoDrd2KO en el experimento de TP no se debe a su hiperactividad, sino a una mayor motivación para trabajar por la comida.



## Conclusiones y Discusión

El presente trabajo intenta aportar evidencias sobre la participación del D2R en las neuronas dopaminérgicas y la regulación que ejerce sobre la neurotransmisión. Nuestros resultados muestran que la inactivación selectiva del gen *Drd2* específicamente en las neuronas que expresan el DAT indujo la pérdida total de la expresión del D2R en las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio (Figura 23).

En consecuencia, esto impidió que la dopamina induzca corrientes inhibitorias postsinápticas en el soma y autoinhibición en los terminales de neuronas dopaminérgicas normalmente mediadas por la dopamina estriatal. Así, mientras que cinco subtipos de receptores de dopamina organizan todas las respuestas de dopamina postsinápticas, (i) la autoinhibición mediada por dopamina sobre la actividad de las mismas neuronas dopaminérgicas, (ii) la liberación de dopamina y (iii) la síntesis de dopamina parecen estar mediadas principalmente por el D2R.



**Figura 23. Esquema comparativo de las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio de ratones *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* y ratones *autoDrd2KO*.** La ausencia de autorreceptores en ratones *autoDrd2KO* conduce al aumento de la síntesis y liberación de dopamina en comparación con ratones *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>*.

Existe una controversia a lo largo de los años en la literatura respecto de qué subtipos de receptores de dopamina participan como receptores presinápticos. Existen trabajos que sugieren la participación de D3Rs actuando como autorreceptores que controlan la neurotransmisión dopaminérgica y la síntesis de dopamina (Bückholtz *et al.*, 2010; Joseph *et al.*, 2002; Maina y Mathews, 2010; O'Hara *et al.*, 1996) y otros que presentan evidencias en contra de esta posibilidad (Koeltzow *et al.*, 1998). Nuestros resultados ayudan a resolver este debate ya que muestran que ningún otro miembro de la subfamilia D2 compensa la pérdida de función del autorreceptor dopaminérgico en ratones autoDrd2KO, en ninguna de sus funciones conocidas y estudiadas.

Otra controversia que los ratones autoDrd2KO ayudan a aclarar es, si los autorreceptores D2 regulan la recaptación de dopamina, modulando la actividad del DAT, como se sugirió anteriormente (Meiergerd *et al.*, 1993; Parsons *et al.*, 1993; Cass y Gerhardt, 1994; Iannazzo *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 1999; Kimmel *et al.*, 2001). El análisis del decaimiento de la concentración de dopamina en presencia de cocaína y de metilfenidato demostró que la recaptación de dopamina mediada por el DAT no se ve alterada en ausencia de autorreceptores D2. Los trabajos que originalmente sugirieron una regulación utilizaron técnicas electroquímicas, electrofisiológicas y bioquímicas combinadas con farmacología (Cass y Gerhardt, 1994; Iannazzo *et al.*, 1997; Kimmel *et al.*, 2001; Meiergerd *et al.*, 1993; Parsons *et al.*, 1993; Jones *et al.*, 1999). Otros trabajos más modernos sostuvieron estos resultados utilizando técnicas moleculares en ensayos *in vitro* con líneas celulares en cultivo que demostraban capacidad potencial de ambas proteínas de interactuar físicamente (Mayfield y Zahniser, 2001). Finalmente, otros reportaron que la estimulación de D2R aumenta la cantidad de transportadores translocados a la membrana celular (Lee *et al.*, 2007). Incluso, trabajos que utilizaron técnicas de ingeniería genética para la construcción de ratones mutantes deficientes en *Dat* o *Drd2*, también mostraron que la estimulación de D2R regulaba de manera positiva la actividad del DAT aumentando la recaptación de dopamina (Jones *et al.* 1999, Dickinson *et al.*, 1999; Benoit-Marand *et al.*, 2001; Schmitz *et al.*, 2002). En contra de estos antecedentes, los resultados obtenidos en este trabajo en el que utilizamos una delección limpia del *Drd2* de neuronas dopaminérgicas sin la necesidad de utilizar compuestos de selectividad dudosa para este subtipo de receptor particular y una técnica optimizada para la detección específica de la dopamina liberada como es la voltametría cíclica, mostraron de manera contundente que

cuando los autorreceptores D2R están ausentes no se observan alteraciones detectables en la actividad del DAT.

Los autorreceptores D2 juegan un rol clave en la liberación de dopamina, habiendo demostrado aquí que la falta de autorreceptores provoca aumentos muy marcados en su liberación, que pueden ser observados ya en pulsos simples de estimulación. Este resultado no concuerda con lo observado en ratones mutantes nulos para el receptor D2 donde se vio que frente a la estimulación con un pulso simple la cantidad de dopamina liberada es menor que en ratones control (Schmitz *et al.*, 2002), y contradice otros donde simplemente no observaron diferencias (Dickinson *et al.*, 1999; Rougé-Pont *et al.*, 2002).

El exagerado nivel de dopamina extracelular detectada frente a una estimulación sostenida que simula una cinética de liberación fásica reveló el estricto control regulatorio que los autorreceptores D2 normalmente ejercen sobre la liberación de dopamina. En estos experimentos pudimos observar una participación fundamental de la regulación de los autorreceptores D2 ya que la concentración de dopamina extracelular aumenta a niveles máximos que se mantienen durante todo el tren de estimulación y sólo disminuyen una vez finalizado. De esta manera, los ratones autoDrd2KO pierden la regulación sobre la liberación de dopamina pero son capaces de mantener aún dos tipos de cinética de liberación bien diferenciadas, tónica y fásica, a diferencia de otros modelos de ratones mutantes como los deficientes en DAT que no presentan diferencias en los niveles extracelulares de dopamina alcanzados en situaciones de estimulación simple y sostenida (Benoit-Marand *et al.*, 2000). De esta manera, los ratones autoDrd2KO constituyen un modelo de hiperdopaminergia crónica donde la dopamina liberada aún puede señalar procesos diferentes alcanzando concentraciones diferenciables pero siempre mayores en respuesta a cada tipo de estímulo.

Este hallazgo fue importante ya que clásicamente se menospreció la contribución de los autorreceptores en la regulación al posicionarse al DAT como el principal actor en la regulación de la liberación fásica (Rice *et al.*, 2011). Nuestros resultados exponen el grado de sinergismo con el que trabajan el DAT y el autorreceptor D2 para limitar el tiempo de acción de una neurotransmisión masiva de dopamina producida durante un tren de estimulación. En ausencia autorreceptores D2, el DAT es incapaz de cumplir solo con esta función. La contundencia de este hallazgo posiciona a los ratones autoDrd2KO como un

modelo novedoso y valioso para el estudio de mecanismos de control de la liberación de neurotransmisores.

A diferencia de los ratones mutantes nulos para el D2R, que carecen totalmente de receptores D2 en todos los tipos de neuronas, que mostraban una menor actividad locomotora (Baik *et al.*, 1995; Kelly *et al.*, 1998) y una respuesta anómala de recompensa de la cocaína (Chausmer *et al.*, 2002; Welter *et al.*, 2007) y de otras drogas de abuso (Maldonado *et al.*, 1997; Phillips *et al.*, 1998; Cunningham *et al.*, 2000); nuestros ratones autoDrd2KO muestran hiperactividad en ambientes novedosos y familiares y una mayor motivación para buscar recompensas. Estas notables diferencias fenotípicas observadas entre ratones *Drd2*<sup>-/-</sup> y ratones autoDrd2KO resaltan el valor de los modelos de ratones mutantes condicionales en células específicas ya que permiten diseccionar la participación del producto del mismo gen en neuronas diferentes. Es razonable entonces, pensar que los fenotipos observados en cada modelo de ratón mutante sean debido a la ausencia primaria de los D2R junto con los mecanismos compensadores secundarios que son propensos a desarrollar con la pérdida crónica del receptor, y en el caso de ratones autoDrd2KO, de la hiperdopaminergia crónica que se produciría.

Si bien se podía predecir que la falta de D2R presinápticos llevaría a un aumento en la síntesis y la liberación de dopamina y, por lo tanto, a un fenotipo de hiperactividad, aquí se pudo demostrar la magnitud en que estos mecanismos de control operan *in vivo*. Pudimos observar que el aumento de la actividad locomotora en ratones autoDrd2KO es consistente pero moderado, en especial si se compara este modelo con otros ya existentes, como el mutante nulo para DAT, ratones hiperactivos debido a una gran concentración de dopamina extracelular (Gainetdinov *et al.*, 1999). A diferencia de aquel modelo, éste presenta un aumento de la actividad locomotora del 50 % aproximadamente y las diferencias no son superiores solamente durante el primer día, sino que se mantienen a lo largo de los días aunque van disminuyendo con el tiempo. Además, varios modelos de ratones con alteraciones genéticas que resultaron hiperactivos mostraron alteraciones en conductas de evaluación de riesgo o conflicto (Avale *et al.*, 2004; Giros *et al.*, 1996; Zhuang *et al.*, 2001); sin embargo, la evaluación de la conducta de los ratones autoDrd2KO en diversas situaciones y paradigmas donde se presentan conflictos de aproximación/evitación demostró que éstos ratones, si bien son hiperactivos, presentan

una normal evaluación del riesgo discriminando ambientes potencialmente peligrosos (evaluado a través del laberinto en cruz elevado y el análisis por zonas de la locomoción espontánea), y no manifiestan alteraciones en conductas relacionadas a la ansiedad (test de luz/oscuridad) ni de falta de atención y memoria a corto plazo (evaluado en el test del objeto novedoso). Es decir, que la falta de autorreceptores que normalmente regulan la neurotransmisión dopaminérgica, provoca un fenotipo de hiperactividad "controlada".

Los ratones autoDrd2KO se mostraron supersensibles a los efectos de agonistas y antagonistas de tipo D2. Los resultados obtenidos en respuesta a la administración de haloperidol son consistentes con la idea de que normalmente el bloqueo que ejerce el haloperidol sobre los D2R postsinápticos compite con un aumento simultáneo de dopamina extracelular provocada por la acción del mismo haloperidol sobre los receptores presinápticos. Dado que este último efecto no se produce en ratones autoDrd2KO por carecer de autorreceptores, estos ratones resultan supersensibles a la acción del fármaco. Sin embargo, el aumento crónico en los niveles de dopamina extracelulares en ratones autoDrd2 podría haber conducido a una subsensibilidad postsináptica en D2R. Otros modelos de ratones hiperdopaminérgicos también mostraron alteraciones en la respuesta al haloperidol. Ratones mutantes nulos para el DAT necesitaron de dosis más altas de haloperidol para evidenciar un efecto en la disminución de la locomoción si se comparaban con ratones control, lo que implicaría diferencias con nuestro modelo particular. Sin embargo, cuando el haloperidol se administró a dosis mayores, la disminución en la locomoción inducida por haloperidol fue mucho mayor a la observada en ratones control, sugiriendo una posible supersensibilización (Spielewoy *et al.*, 2000).

La supersensibilidad al haloperidol descartó la existencia de este efecto sobre D2R postsinápticos. Para investigar este efecto evaluamos la respuesta a cocaína como un agonista dopaminérgico indirecto D1/D2. Sin embargo, a pesar de la normal función del DAT, los ratones autoDrd2KO resultaron hipersensibles a la cocaína, tal vez debido a los efectos aditivos combinados de bloqueo del DAT y la ausencia de inhibición presináptica que eleva, aún más, los niveles de dopamina extracelular y maximiza la estimulación de los receptores dopaminérgicos postsinápticos.

La supersensibilidad a los efectos psicomotores de la cocaína observada sobre la locomoción se correlacionó con la supersensibilidad a los efectos reforzantes de la droga

observada en experimentos de condicionamiento por preferencia de lugar. Resultados de experimentos de sensibilización locomotora a cocaína a través de inyecciones repetidas mostraron que los ratones autoDrd2KO están pre-sensibilizados sin necesidad de exposición previa a la droga. Esto es coincidente con los antecedentes (expuestos en la Introducción general) que sostienen que el estado de sensibilización se alcanza a través de la disminución en la sensibilidad de los autorreceptores (White y Wang, 1984) generando un aumento en la excitabilidad de las neuronas dopaminérgicas y un consiguiente aumento en la liberación de dopamina. Los niveles de dopamina liberada en ratones autoDrd2KO son lo suficientemente elevados para inducir un estado de pre-sensibilización que se evidencia ya en la respuesta locomotora inducida por una única dosis de cocaína. La mayor sensibilidad a la cocaína y la pre-sensibilización observada en ratones autoDrd2KO podría sugerir que menores niveles de autorreceptores predispongan a la toma y abuso de drogas.

Se ha propuesto que los bajos niveles de D2R en los seres humanos (Volkow *et al.*, 2009), monos (Morgan *et al.*, 2002) y roedores (Thanos *et al.*, 2001), predisponen a los animales a la autoadministración compulsiva de drogas. En este contexto, se ha planteado la hipótesis de que el consumo repetitivo de drogas compensa la disminución en la activación de los D2R postsinápticos que participan en los circuitos de recompensa (Volkow *et al.*, 2009, 1999). Sin embargo, no está claro a partir de estos estudios si una menor disponibilidad de D2R en estriado es debido a una densidad reducida del D2R o a un aumento de la liberación de dopamina que está compitiendo con el ligando marcado. Además, la regulación negativa en la expresión de D2R postsinápticos podría resultar como un mecanismo compensatorio frente a una transmisión dopaminérgica excesiva. Como nuestros resultados mostraron que ratones autoDrd2KO resultaron supersensibles a las propiedades gratificantes de la cocaína y con una transmisión dopaminérgica excesiva; se sugiere que niveles bajos de autorreceptores presinápticos D2 también podrían predecir el aumento en la susceptibilidad a la búsqueda y abuso de drogas. De hecho, un estudio reciente realizado en humanos mostró que niveles bajos de D2R en el cerebro medio correlacionaban con una mayor impulsividad y un fuerte deseo subjetivo por el consumo de anfetamina (Bücker *et al.*, 2010).

La esquizofrenia se asocia en parte con un desorden en la neurotransmisión dopaminérgica

donde niveles de dopamina estriatales aumentados y niveles corticales reducidos correlacionan con síntomas positivos y negativos de la enfermedad, respectivamente (Seeman et al., 2005; Strange, 2008). La atenuación de la actividad dopaminérgica es necesaria para lograr el éxito de drogas antipsicóticas, ya sean neurolépticos típicos como el haloperidol o atípicos como el aripiprazole (Strange, 2008). Los antipsicóticos típicos tratan los síntomas positivos de la esquizofrenia pero traen como efectos secundarios desórdenes en los circuitos extrapiramidales (motores) como ser la distonia aguda, acinesia, parkinsonismo y disquinesia tardía. Estudios recientes de PET mostraron que la mejoría en los síntomas ocurre cuando el nivel de ocupación de receptores D2/D3 por la droga alcanza el 50 – 70 % (Nyberg *et al.*, 1995; Kapur *et al.*, 2000, Frankle *et al.* 2004) y dado que, durante un episodio psicótico hay un incremento de 2 veces la concentración de dopamina en el estriado (Laruelle *et al.*, 1999), se sugiere que el control de los síntomas del episodio psicótico es muy sensible a los niveles de dopamina. En el caso de la esquizofrenia se desconoce si hay un aumento en la densidad de receptores postsinápticos (Abi-Dargham *et al.*, 2000) pero se sabe que los receptores D2 se encuentran en un estado de supersensibilidad a la dopamina y a agonistas dopaminérgicos (Curran *et al.*, 2004). A pesar de que desconocemos el grado de ocupación de receptores D2 en los ratones autoDrd2KO, la supersensibilidad observada y la liberación dopaminérgica aumentada podría correlacionar con lo observado en la esquizofrenia.

Nuestros resultados mostraron no sólo alteraciones en la respuesta a refuerzos artificiales como la cocaína, sino también en respuesta a refuerzos naturales como la comida. En paradigmas de comportamiento operante, consecuentemente con observaciones que sostienen que la dopamina juega un rol importante en la modulación de la tendencia a trabajar por una recompensa (Salamone *et al.*, 2005), los ratones autoDrd2KO mostraron una mayor motivación para trabajar por la comida. Sin embargo, este aumento en la motivación no implica un aumento en el placer que genera la comida en los animales (Berridge y Robinson, 1998; Palmiter, 2008), y consecuentemente, las curvas de crecimiento entre ratones autoDrd2 y *Drd2*<sup>loxP/loxP</sup> son iguales y tampoco se observan diferencias en la cantidad de *pellets* que consumen en paradigmas de tasas fijas bajas. Esto mismo ocurre en otros modelos de ratones hiperdopaminérgicos que tienen el 10 % del DAT total (Peciña *et al.*, 2003).

Tanto los niveles de dopamina fásicos como tónicos han sido implicados en comportamientos dirigidos a la comida y los niveles de motivación aumentados en el trabajo que ratones autoDrd2KO están dispuestos a realizar por la comida evidencian que la dopamina juega un rol fundamental en la generación de conductas de aproximación a objetivos (Berridge y Robinson, 1998). El aumento de la motivación por la comida inducida por una liberación aumentada de dopamina en ratones autoDrd2KO coincide con el aumento observado en la motivación por la comida en esquemas operantes progresivos frente a la administración local de anfetamina en el NAcc (Di Ciano *et al.*, 2001).

Como mencionamos anteriormente, la transmisión dopaminérgica es crucial para generar un estado de motivación suficiente para ir a buscar recompensas (Berridge y Robinson, 1998; Salamone *et al.*, 2007) y establecer memorias de estímulos asociados a esas recompensas (Dalley *et al.*, 2005). Sin embargo, cuando esta señalización se produce en exceso, podría traer consecuencias negativas en la adaptación al medio ambiente. Patologías de la neurotransmisión dopaminérgica, como pacientes con enfermedad de Parkinson tratados con agonistas dopaminérgicos en forma crónica (Dagher y Robbins, 2009; Voon *et al.*, 2007; Weintraub *et al.*, 2006), pueden disparar la aparición de desórdenes compulsivos en conductas que abarcan apuestas compulsivas, ingesta descontrolada e hipersexualidad (Voon *et al.*, 2007). En el experimento de tasa fija incremental en el que los ratones tenían que presionar una palanca 100 veces para recibir un *pellet*, los ratones autoDrd2KO no sólo superaron a sus hermanos control sino que también mostraron presiones compulsivas de palanca, ya que trabajaron para obtener muchos más *pellets* que los necesarios para sus necesidades diarias de consumo de alimentos (Fig. 6a). Por lo tanto, los ratones autoDrd2KO pueden constituir un modelo valioso para conectar la neurobiología de la motivación con la del comportamiento compulsivo y niveles variables de autorreceptores D2 podrían conducir a diferencias en la susceptibilidad a desarrollar conductas compulsivas.

En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo ponen de manifiesto el papel fundamental regulatorio normativo que autorreceptores D2 juegan en la neurotransmisión de dopamina, y sugiere que la regulación transcripcional del *Drd2* en las neuronas de dopamina puede contribuir a las reacciones individuales de comportamiento hacia recompensas naturales y drogas de abuso.



Hasta el momento había sido imposible estudiar la contribución de los receptores presinápticos dopaminérgicos en estudios *in vivo* tanto mediante acercamientos farmacológicos, debido a la falta de compuestos específicos para D2R presinápticos, como mediante el uso de ratones modificados genéticamente ya que todos los modelos generados de mutantes nulos para el D2R carecían tanto de receptores presinápticos como postsinápticos.

Si bien se avanza en el conocimiento de la función de autorreceptores D2 en relación con algunas conductas particulares, será necesario en el futuro diseñar y realizar nuevos estudios que permitan superar algunas limitaciones que nuestro modelo presenta. Por un lado, la remoción génica de los D2R de las neuronas dopaminérgicas comienza durante el desarrollo dirigida por la expresión del DAT a partir del día embrionario 14,5. De esta manera, los animales carecen de autorreceptores durante todo el desarrollo. Probablemente, este defecto pudiera dar lugar a la inducción o adquisición de programas alternativos durante el desarrollo que tiendan a compensar la falta de autorreceptores. Para evitar, esta posibilidad, es que nosotros planteamos la necesidad de perfeccionar los modelos de estudio en el futuro, generando ratones en los que se pueda remover genes de manera localizada en una región particular y en un momento específico en la vida de un animal con evaluación del fenotipo resultante.

En conjunto, nuestros resultados resaltan el papel fundamental que los autorreceptores D2 tienen en la neurotransmisión dopaminérgica y sugieren que la regulación transcripcional de *Drd2* en las neuronas dopaminérgicas puede contribuir a las reacciones individuales de comportamiento hacia las recompensas naturales y drogas de abuso (Kenny *et al.*, 2011; Volkow *et al.*, 2009).

## **CAPÍTULO 2**

**Estudio de la participación de receptores D2 en el cerebro de  
ratones adultos.**

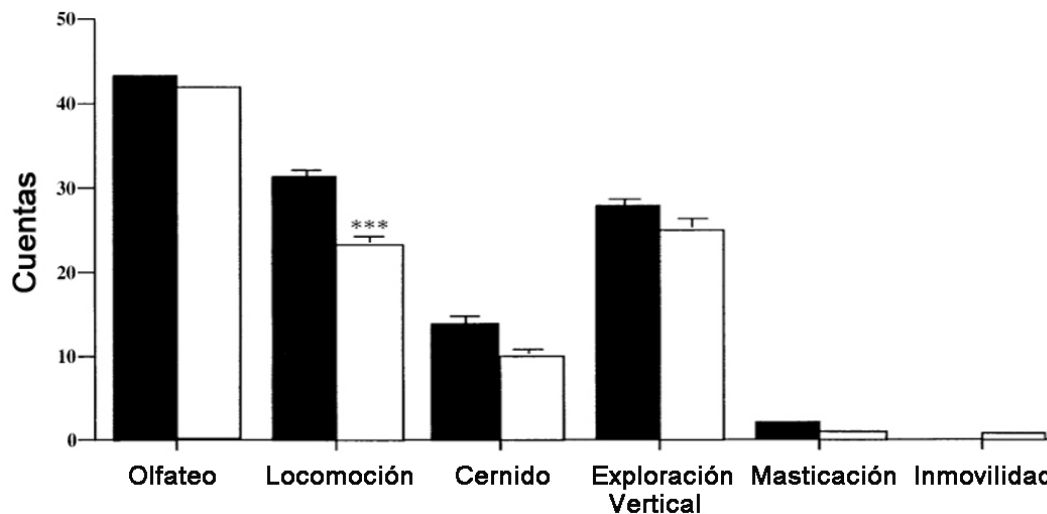
## Introducción

---

Se han publicado numerosos trabajos demostrando la importancia del D2R en la modulación de las respuestas mediadas por la dopamina. Inicialmente, la asignación de funciones a estos receptores se basó en estudios farmacológicos utilizando agonistas y antagonistas dopaminérgicos. Sin embargo, estos compuestos actúan sobre todos los receptores "tipo D2" en general y no son capaces de discriminar su acción sobre los diferentes subtipos D2, D3 y D4, dificultando el estudio de las funciones individuales de cada subtipo. Para superar este problema, se generaron ratones genéticamente modificados con deleciones alélicas específicas de un gen en particular (ratones *knockout*). Tres grupos de investigación diferentes han aplicado esta tecnología para generar ratones deficientes en receptores del subtipo D2 (Baik *et al.*, 1995; Kelly *et al.*, 1997, 1998; Jung *et al.*, 1999) y, utilizando distintas estrategias genéticas, demostraron datos neuroquímicos comparables evidenciando la pérdida de D2R funcionales.

A pesar de que los 3 grupos mostraron la importancia del D2R en distintos aspectos de la conducta, se evidenciaron inconsistencias en relación con el grado de déficit conductual y la gravedad de los fenotipos neurológicos reportados. En Baik *et al.* (1995) se reportó que ratones mutantes nulos para el D2R mostraban un síndrome de tipo *parkinsoniano* con anormalidades en la postura y la marcha, incapacidad para reproducirse, problemas de coordinación motora, catalepsia espontánea y una marcada reducción de la locomoción en un campo abierto. Por el contrario, en Kelly *et al.* (1998) se encontró que los ratones deficientes en D2R no presentaban tal fenotipo neurológico y que, si bien mostraban una locomoción reducida, el fenotipo observado no era tan severo como se había reportado en Baik *et al.* (1995). En Jung *et al.* (1999) se observó que los ratones *knockout* para el *Drd2* tenían problemas neurológicos similares a los de Baik *et al.* (1995) como postura anormal y disminución marcada de la locomoción. Las diferencias encontradas entre los distintos grupos podrían ser explicadas en base al *background* genético de los ratones utilizados en cada uno de los trabajos (Kelly *et al.*, 1998). De todas maneras, un cuarto laboratorio, comparó ratones de las líneas *knockout* generadas por Baik *et al.* (1995) y por Kelly *et al.* (1998) y concluyó que, si bien muestran una modesta pero robusta disminución en la actividad locomotora, no se observaron anormalidades en la postura, catalepsia, temblor ni ataxia; en consecuencia, no pudieron determinar la existencia de un síndrome de tipo

*parkinsoniano* en ninguna de estas líneas (Clifford *et al.*, 2000, 2001).



**Figura 1. Evaluación conductual de ratones salvajes y mutantes nulos para el receptor D2 según Clifford *et al.* (2001).** Se muestran las cuentas conductuales en ratones tipo salvajes (n=24, barras negras) y mutantes nulos para D2 (n=25, barras blancas) generados en Kelly *et al.* (1997) para las siguientes conductas: olfateo, locomoción, cernido (movimiento característico con las patas delanteras en el recubrimiento del piso de la jaula), exploración vertical, masticación, inmovilidad. Los datos se recolectan durante la hora inicial de la exploración en un campo abierto. Referencias: \*\*\* $p < 0.001$  contra control.

Si bien estos resultados confirmaron el rol del D2R en aspectos centrales de la locomoción como la iniciación de movimientos, la relación entre el tiempo en movimiento e inmovilidad y la distancia total recorrida (Kelly *et al.*, 1998), lejos estuvieron de asemejarse al efecto de catatonia observado al bloquear de manera aguda los D2R con antagonistas como el haloperidol en ratones normales. De hecho, el severo efecto que produce la falta de estimulación dopaminérgica en pacientes con enfermedad de Parkinson, predisponía a los investigadores a encontrar un déficit locomotor mucho más importante en ratones deficientes en D2R. En consecuencia, se hipotetizó sobre la aparición de compensaciones durante el desarrollo que pudieran explicar las funciones locomotoras relativamente normales de estos ratones.

### **Alteraciones en las funciones de los ganglios basales**

Como se mencionó en la Introducción general, los ganglios basales son un grupo de núcleos subcorticales involucrados en el control del movimiento y las lesiones de éstos se

han asociado a desórdenes del movimiento (Redgrave *et al.*, 2010). Las neuronas de los núcleos de salida (GPi/SNr) inhiben tónicamente el tálamo y el tallo cerebral. Esta inhibición tónica, es capaz de desbloquearse frente a liberaciones fásicas de dopamina que actúan sobre ambas vías directa e indirecta favoreciendo el movimiento.

En un estadio *parkinsoniano*, la falta de liberación de dopamina en el estriado evita la inhibición de la vía indirecta y la estimulación de la vía directa contribuyendo a una activación excesiva de los núcleos de salida inhibitorios de los ganglios basales. Por el contrario, en un estadio disquinético, hay una reducción de la actividad de los núcleos de salida que favorece la aparición de movimientos involuntarios y repetitivos (Redgrave *et al.*, 2010).

### **Control del comportamiento orientado a objetivos y automatizado**

Los ganglios basales participan de los circuitos neuronales involucrados tanto en las conductas ***orientadas a objetivos*** como en la formación de ***hábitos***. Aprender a ejecutar y automatizar ciertas acciones es esencial para la supervivencia. El aprendizaje de nuevas habilidades por prueba y error, como andar en bicicleta o tocar el piano, se caracteriza por una fase inicial de mejoras rápidas en el rendimiento, seguida de una fase de mejoras más graduales mientras las habilidades se consolidan y el rendimiento se vuelve asintótico. (Karni *et al.*, 1998; Miyachi *et al.*, 2002, 1997; Kargo y Nitz, 2004).

En la primera fase, los movimientos se realizan de manera consciente y la selección de una acción está determinada principalmente por la utilidad relativa de los resultados obtenidos. Este tipo de conducta se denomina *orientada a objetivos* y es susceptible a interferencias (Shriffin y Schneider, 1977). A medida que aumenta el entrenamiento, la conducta repetida se automatiza y el control de esta conducta será de tipo estímulo-respuesta. Este tipo de conducta se denomina *hábito* (Adams y Dickinson, 1981). Luego de la consolidación de una rutina motora, el recuerdo de cómo hacer las cosas es de larga duración y, en el caso de habilidades bien aprendidas, puede durar toda la vida. Una vez que las tareas se automatizan es difícil revertir a un control voluntario sobre las mismas (Schneider y Chein, 2003).

Experimentos realizados por Yin *et al.* (Yin y Knowlton, 2006; Yin *et al.*, 2006a, 2006b, 2005a,

2005b) demostraron que la región dorsomedial del estriado regula la conducta *orientada a objetivos* (asociativa), mientras que la región dorsolateral del estriado regula la formación de *hábitos* (sensorimotora). De esta manera, durante entrenamientos largos de tareas motoras el patrón de activación en el estriado migra gradualmente desde la región dorsomedial hacia la dorsolateral (Jueptner *et al.*, 1997; Lehericy *et al.*, 2005). Ambos tipos de conductas parecen converger en una vía común ya que la misma acción puede ser ejecutada de manera *orientada a objetivos* o en forma automática y la manera en que ésta se decide ejecutar según las circunstancias definen la capacidad de acción de los ganglios basales.

Pacientes que sufren de Parkinson muestran problemas en la adquisición y automatización de nuevas rutinas motoras, especialmente durante las etapas tempranas de la enfermedad (Schwab *et al.*, 1954; Hoshiyama *et al.*, 1994; Knowlton *et al.*, 1996). Por lo tanto, los pacientes sólo pueden controlar los movimientos de manera orientada a objetivos y no son capaces de formar nuevos hábitos a pesar del sobreentrenamiento (Faure *et al.*, 2005). Es por esta razón, que los movimientos ahora son de procesamiento lento, a diferencia de movimientos automatizados de procesamiento rápido (Schneider y Chein, 2003). Además, esta ausencia de formación de *hábitos* sólo permite la ejecución de movimientos en forma *orientada a objetivos* y los transforma susceptibles a interferencias. (Schwab *et al.*, 1954; Benecke *et al.*, 1986; Nieuwboer *et al.*, 2009). De esta manera, los pacientes *parkinsonianos* necesitan de una decisión consciente para comenzar a caminar y se detienen de forma abrupta si son distraídos por un estímulo externo (Hallet, 2008, Okuma y Yanagisawa, 2008). En etapas más avanzadas de la enfermedad, los pacientes pueden manifestar además déficits motores en la ejecución de tareas dirigidas a objetivos.

El rol de la dopamina durante las distintas fases del aprendizaje de rutinas motoras es complejo, no sólo porque los mecanismos de regulación de la liberación y recaptación presentan variaciones regionales (Wickens *et al.*, 2007; Jedynak *et al.*, 2007), sino también porque la dopamina ejerce su efecto sobre dos poblaciones distintas de neuronas estriatales: las que expresan D1R y las que expresan D2R. El grupo de Yin *et al.* (2009) encontró que, luego del entrenamiento extensivo, las neuronas espinosas medianas estriofugales (NEMs) que expresan D2R muestran un aumento preferencial en la fuerza sináptica en comparación con las NEMs que expresan D1R. Estos resultados son

consistentes con otros trabajos que reportan la existencia de LTP en estas neuronas (Schen *et al.*, 2008; Flajolet *et al.*, 2008). La activación de receptores de adenosina A2A que colocalizan con los D2R es crítica para la formación de LTP. Por lo tanto, cambios a largo plazo encontrados en la región dorsolateral del estriado son dependientes específicamente de NEMs que expresan D2R. El rendimiento de una habilidad luego del entrenamiento extensivo se vuelve menos dependiente de la activación de D1R.

Utilizando como paradigma el aprendizaje motor sobre el *rotarod*, los investigadores observaron que el rendimiento en este test se volvió independiente de la activación de D1R luego del entrenamiento extensivo pero que todavía requería de la activación de D2R (Yin *et al.*, 2009). Basándose en la afinidad diferencial de ambos receptores por dopamina proponen que durante las etapas tempranas de adquisición de una nueva habilidad, cuando las neuronas dopaminérgicas muestran respuestas de activación fásicas, se activarían los D1R. Con el entrenamiento extensivo y el desarrollo de la automaticidad, las señales fásicas se vuelven menos frecuentes (Ljungberg *et al.*, 1992), por lo que la dopamina liberada activaría los D2R principalmente.

Los resultados del grupo de Yin *et al.* (2009) se realizaron administrando agonistas y antagonistas dopaminérgicos, los cuales ya mencionamos que carecen de selectividad específica por los distintos subtipos de receptores. Es por eso que se decidió estudiar qué sucede en este tipo de conductas locomotoras cuando se pierden los receptores D2 durante la vida adulta utilizando modelos genéticos que nos permitan afectar de manera específica este subtipo particular.

## Objetivos

---

### Objetivos generales

Evaluar los efectos de la pérdida de los receptores D2 en animales adultos respecto de los mutantes clásicos que compensan la pérdida temprana del receptor D2 y determinar cuál es el mejor modelo animal donde estudiar las funciones de este receptor.

### Objetivos específicos

#### Objetivo 1

Generar animales que permitan inducir la delección de los receptores dopaminérgicos D2 de manera temporo-específica.

#### Objetivo 2

Estudiar posibles alteraciones en patrones locomotores; en el aprendizaje y ejecución de habilidades motoras y en la respuesta a drogas que actúen sobre el sistema dopaminérgico.



## Resultados

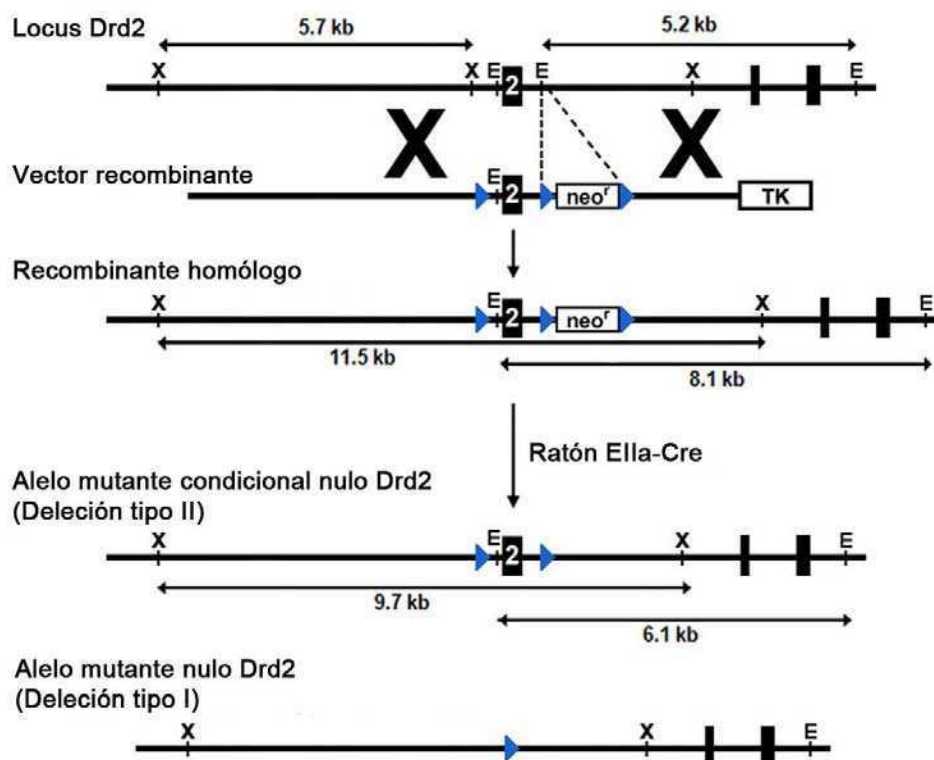
---

### Generación de ratones mutantes inducibles para el receptor D2

Para estudiar el efecto de la pérdida de receptores D2 durante la vida adulta, se decidió generar ratones que crezcan normalmente hasta la adultez y que permitan, luego, inducir la delección alélica del gen *Drd2*. Estos ratones mutantes inducidos se compararían con ratones normales y con ratones mutantes nulos constitutivos para el D2R desde el nacimiento.

Los ratones mutantes nulos constitutivos para el D2R habían sido previamente generados en nuestro laboratorio como un producto secundario durante la generación de los ratones mutantes condicionales para el D2R (Figura 1). Estos ratones con una delección del exón 2 permanente denominados *Drd2*KO se conservaron como una línea separada y también fueron retrocruzados con ratones de la cepa C57Bl6/J por más de 10 generaciones para homogeneizar su *background* genético. Este ratón *knockout* no se parece a modelos anteriores ya publicados de mutantes nulos para el D2R, sino que es un nuevo modelo que sirve como control de nuestros experimentos, ya que cuando recombina el mutante condicional, los alelos nulos resultantes serían exactamente iguales a los del *Drd2*KO.

Para obtener ratones que permitieran deleccionar los receptores de manera controlada temporalmente, se generaron ratones mutantes condicionales inducibles. Para ello, se cruzaron dos líneas de ratones: el mutante condicional para el D2R generado en nuestro laboratorio (*Drd2*<sup>loxP/loxP</sup>) con ratones CMV-Cre.ER<sup>TM</sup> (Hayashi y McMahon, 2002). Estos últimos expresan en forma ubicua la proteína de fusión Cre.ER<sup>TM</sup> (recombinasa *Cre* fusionada al dominio de unión a ligando del receptor de estrógeno). Este dominio está modificado de manera de ganar afinidad por el tamoxifeno y perder afinidad por los estrógenos endógenos. Así, la proteína de fusión se encuentra permanentemente en el citoplasma secuestrada por el complejo de chaperonas de Hsp90. En presencia del ligando el complejo Cre-ER<sup>TM</sup> se transloca al núcleo donde puede ejercer su actividad recombinasa deleccionando las secuencias de ADN flanqueadas por sitios *loxP*. De esta manera, es posible determinar el momento preciso de la recombinación induciéndola con tamoxifeno. Los ratones CMV-Cre.ER<sup>TM</sup> se compraron a Jackson Laboratories y fueron retrocruzados por 5 generaciones hasta homogeneizar el *background* genético en más del 99 % a C57Bl6/J.



**Figura 1. Generación de ratones mutantes condicionales para el receptor D2.** Se muestran la estrategia utilizada para flanquear el exón 2 por dos sitios *loxP*. Los sitios *loxP* se insertaron por mutagénesis dirigida en células madre de ratones de la cepa J1 129S4/Jae. El vector de recombinación utilizado portaba un cassette de resistencia a neomicina para permitir la selección positiva de las células con recombinación exitosa. Los ratones quimera nacidos de la microinyección de las células recombinantes en blastocistos C57Bl6/J fueron cruzados con ratones B6.FVB-Tg(E1a-cre)C5379Lmgd/J (Jackson Laboratory, USA) que expresan la recombinasa *Cre* en forma ubicua para eliminar el cassette de neo. Esto dio lugar a dos ratones diferentes: los mutantes nulos constitutivos producto de una delección tipo I y los mutantes condicionales producto de una delección tipo II. Los triángulos azules indican los sitios *loxP*.

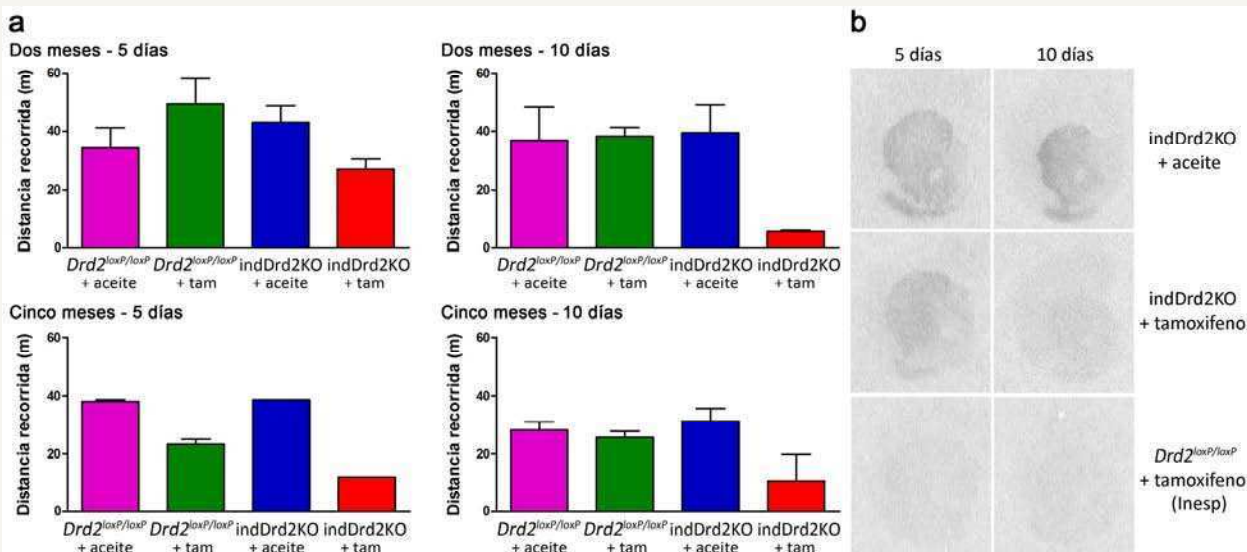
De las cruces sucesivas de ambas líneas resultaron ratones  $Drd2^{loxP/loxP}$ . CMV-Cre.ER<sup>TM</sup> y se los denominaron indDrd2KO, por ser mutantes nulos inducibles. Todos los animales utilizados en este trabajo de tesis resultaron de la cruce de animales  $Drd2^{loxP/loxP}$  con ratones indDrd2KO. Los ratones Drd2KO se mantuvieron como una línea aparte. El seguimiento de la colonia se realizó mediante ensayos de PCR detectando la presencia del alelo  $Drd2^{loxP}$  y de la recombinasa Cre.ER<sup>TM</sup>.

Una vez obtenidos los animales, se trabajó en la puesta a punto de los siguientes parámetros: i) la edad de los animales y ii) el tiempo de administración para lograr un nivel de recombinación tal que delecione la totalidad o la gran mayoría de los receptores

durante la vida adulta (**Box 3**). Se probaron distintas vías de administración pero se seleccionó finalmente la vía intraperitoneal administrando la droga solubilizada en aceite de sésamo (Sigma) como vehículo. Se eligió una dosis subumbral a la dosis letal 50 ( $DL_{50}=75\text{mg/kg}$ ), de 50 mg/kg.

### Box 3 Puesta a punto de la edad y tiempo de administración

Con el objeto de encontrar un esquema de trabajo en donde las diferencias entre un animal inducido y uno sin inducir fueran claramente evidentes; y luego de encontrar una dosis de tamoxifeno que no fuera tóxica para inyectar durante varios días sucesivos, se probaron distintas alternativas. Se decidió evaluar de manera preliminar el efecto de la recombinación en 2 edades diferentes, 2 y 5 meses, luego de 2 protocolos distintos de inyección, durante 5 ó 10 días. Se evaluó solamente el efecto en la locomoción espontánea en cajas de actividad durante 30 min y por 3 días consecutivos.



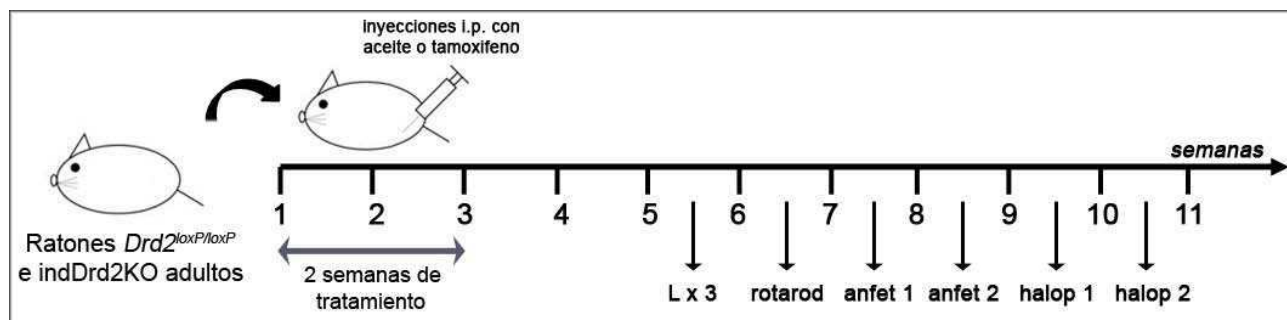
**Figura 2. Respuesta al tratamiento según la edad y el tiempo de administración.** **a.** Locomoción espontánea durante 30 min en los distintos esquemas de administración. Ratones de ambos sexos de dos edades distintas fueron inyectados durante 5 o 10 días con 50 mg/kg de tamoxifeno y 5 días más tarde se evaluó la locomoción durante 3 días consecutivos. Se muestran los resultados para el tercer día de habituación. **b.** Ensayo de unión a ligando radiactivo con [<sup>3</sup>H]-nemonapride en ratones tratados a los 5 meses. Se observa un nivel de recombinación superior con el tratamiento de 10 días de inyecciones en ratones *indDrd2KO* + tam (inesp: inespecífico al competir con un ligando frío).

Los ratones *indDrd2KO* tratados con tamoxifeno muestran menores niveles de locomoción en todos los casos. Contrariamente a lo esperado, no se observaron diferencias significativas entre el tratamiento a los 2 meses y a los 5 meses de edad. En función de estos resultados, se decidió trabajar, en primer lugar, induciendo la recombinación en animales adultos jóvenes de 2 a 3 meses de edad, ya que no se justificaría esperar a que los ratones alcancen una edad más adulta para ver el efecto. Cuando se comparan ambos tiempos de administración, la respuesta parece ser dosis dependiente. A los 2 meses de edad, no se observaron efectos importantes luego de 5 días de inyecciones mientras que, después de 10 días, se vio una disminución muy marcada en la locomoción.

Si bien estos resultados son muy preliminares ya que han podido ser realizados con pocos animales por grupo y se han considerado animales de ambos sexos en conjunto, permitieron decidir que el esquema de trabajo. Así, se definió que se utilizarían ratones adultos de 3 meses de edad y la recombinación sería inducida mediante inyecciones de tamoxifeno durante 10 días consecutivos.

## Determinación del esquema de trabajo

Para poder comparar los distintos grupos de ratones, es necesario que todos los animales hayan pasado por el mismo esquema de experimentos, en el mismo orden exactamente. Es por eso, que para realizar la evaluación conductual de animales adultos, realizamos el esquema de trabajo detallado a continuación.



**Figura 3. Esquema de trabajo.** Ratones adultos de ambos genotipos se inyectan durante 2 semanas con tamoxifeno o vehículo. La tercera semana luego de finalizar las inyecciones comienza la evaluación conductual de los animales. Referencias: **L** para locomoción en cajas de actividad; **anfet** para respuesta a anfetamina; **halop** para respuesta a haloperidol.

Ratones de ambos sexos adultos de 3 meses pertenecientes a los grupos  $Drd2^{loxP/loxP}$  o  $indDrd2KO$  se inyectaron durante 10 días con tamoxifeno en una dosis de 50 mg/kg o con aceite (el vehículo), según corresponda. Nuestro interés será comparar los ratones  $indDrd2KO$  tratados con tamoxifeno contra los ratones mutantes nulos  $Drd2KO$  y contra los controles. El posible efecto que tenga el tamoxifeno será determinado en cada caso al comparar los  $Drd2^{loxP/loxP}$  tratados con aceite contra los  $Drd2^{loxP/loxP}$  tratados con tamoxifeno. La comparación de los ratones  $indDrd2KO$  tratados con aceite contra los ratones  $Drd2^{loxP/loxP}$  servirá para determinar si el alelo  $Cre.ER^{TM}$  genera diferencias fenotípicas independientemente de la inducción de la recombinación.

Transcurridas 3 semanas desde la última inyección, se realizan una serie de ensayos conductuales en el siguiente orden (Figura 3):

1. locomoción espontánea en cajas de actividad por 30 min durante 3 días consecutivos;
2. coordinación motora sobre un *rotarod*;
3. respuesta locomotora a anfetamina (3 mg/kg) y

4. respuesta locomotora a haloperidol (0.3 mg/kg).

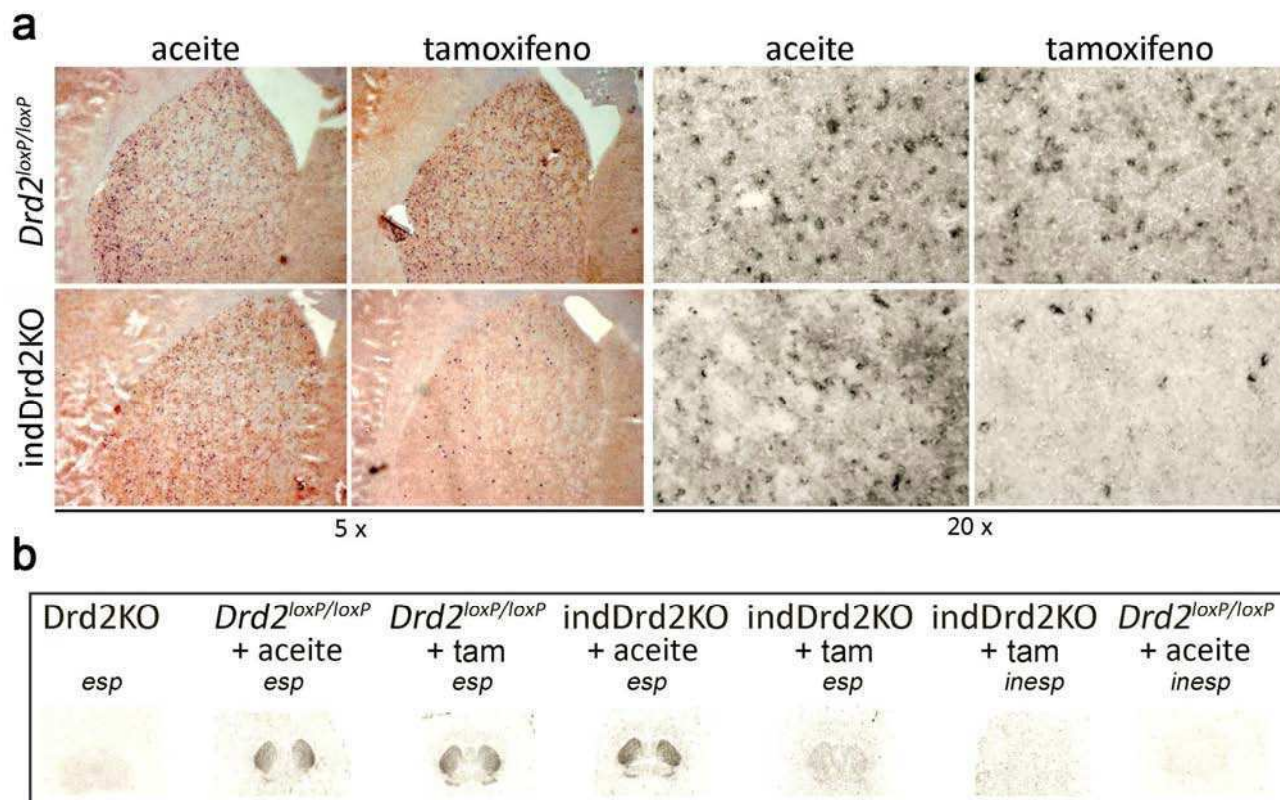
La distancia temporal entre los distintos ensayos se mantiene entre los distintos grupos. Los animales *Drd2*KO se someten a los mismos ensayos pero sin haber sido inyectados ni con aceite ni con tamoxifeno. Se presentan en esta tesis los resultados obtenidos con ratones machos.

### **Evaluación de los niveles de recombinación del gen *Drd2***

Para medir el éxito de la recombinación obtenida con este esquema de trabajo, 10 días después de haber concluido el último experimento conductual sacrificamos a los ratones y extraemos los cerebros para realizar ensayos de hibridación *in situ* detectando los niveles de RNA mensajero y ensayos de unión a ligando radiactivo detectando los niveles de receptores D2.

En los ensayos de hibridación *in situ*, observamos que había una marcada disminución en la expresión de D2R a nivel del estriado (Figura 4a). Esto significa que la administración de 50 mg/kg de tamoxifeno durante 10 días permite anular la expresión de *Drd2* en aproximadamente un 80% de las células que normalmente lo expresan en el cerebro de los animales tratados.

Los ensayos de unión a ligando radiactivo confirmaron que la ausencia de mensajero observada por hibridación *in situ* se correlacionaba con la ausencia de D2R en cortes de cerebro de animales tratados (Figura 4b). Si bien los ratones *indDrd2*KO tratados con tamoxifeno muestran una importante disminución en la cantidad de D2R, se observa una marca remanente cuando se comparan con ratones *Drd2*KO o con su control de marca inespecífica.



**Figura 4. Niveles de recombinación de Drd2. a. Expresión del ARNm de Drd2.** Se realizaron ensayos de hibridación *in situ* utilizando una sonda que permite detectar la presencia del exón 2 del Drd2. Se muestran cortes de cerebro de distintos animales tratados durante 10 días con aceite o con tamoxifeno. Las fotos de la derecha muestran una ampliación en 20x de una región del estriado. **b. Niveles de receptores D2.** Se realizaron ensayos de unión a ligando radiactivo con [<sup>3</sup>H]-nemonapride. Se muestran cortes de cerebro de distintos animales tratados durante 10 días a nivel del cuerpo estriado. (esp: unión específica con ligando radiactivo; inesp: unión inespecífica con ligando frío compitiendo).

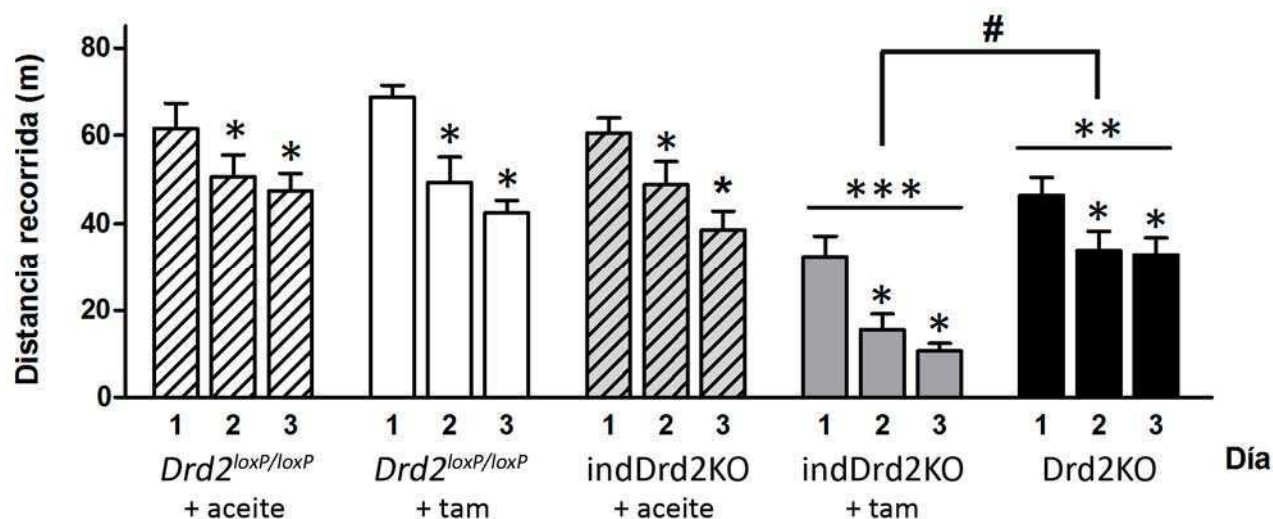
### Análisis de la actividad locomotora espontánea

Para estudiar la importancia del D2R en la locomoción, se midió la actividad locomotora de los 5 grupos durante 30 min por 3 días consecutivos. Las mediciones se realizaron 3 semanas después de haber recibido la última inyección.

Observamos que los ratones *indDrd2KO* tratados con tamoxifeno presentan una marcada disminución en la actividad locomotora con respecto a los controles (Figura 5). Su actividad es todavía menor a la observada para los ratones *Drd2KO*. Si bien todos los grupos se habitúan (disminuyen la actividad a lo largo de los días), estas diferencias se mantienen para los 3 días de habituación. Es decir, que los animales que carecen de D2R tienen disminuidas sus facultades motoras pero aparentemente mantienen la capacidad de



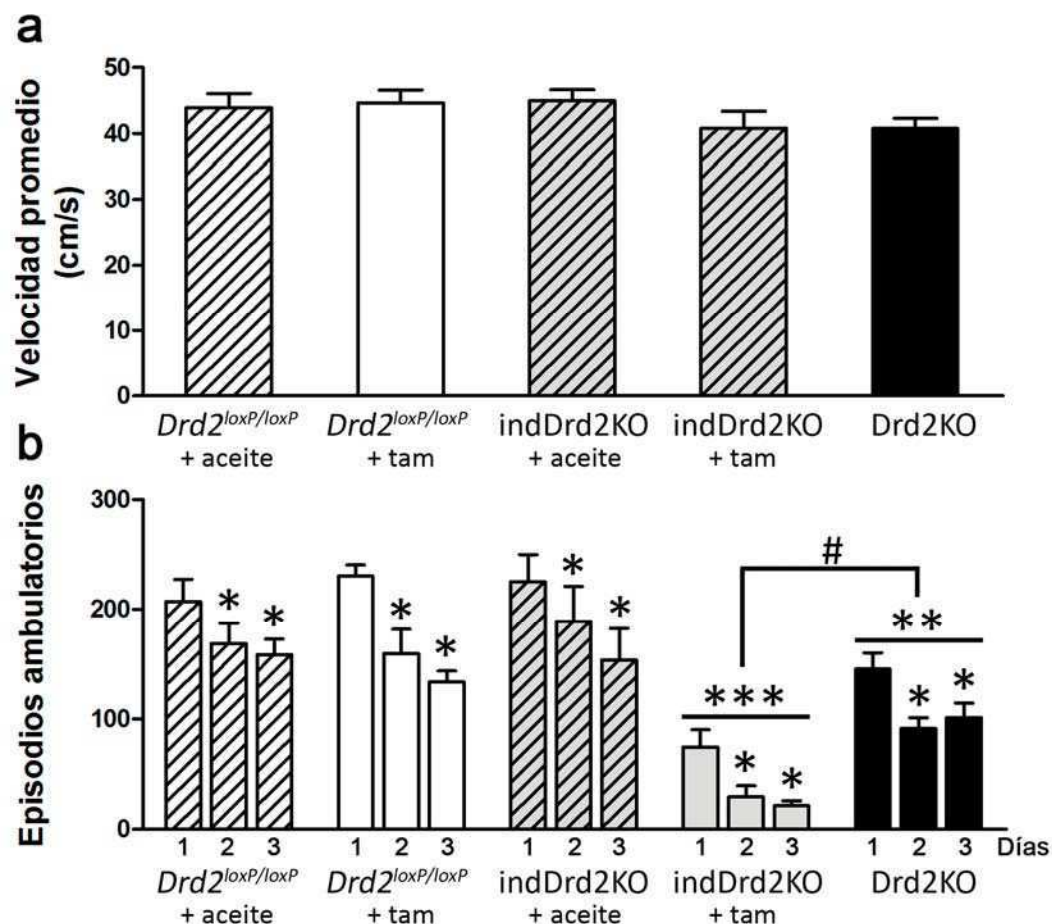
responder frente a un ambiente novedoso.



**Figura 5. Locomoción espontánea en campo abierto durante 30 minutos por 3 días consecutivos.** ANOVA de Medidas repetida. Genotipo:  $F(4,55)=14,43$ ,  $p<0,0001$ . Días:  $F(2,110)=66,39$ ,  $p<0,0001$ . Interacción:  $F(8,110)=1,28$ ,  $p=0,26$ . Análisis *post hoc* de Fisher. Referencias \* $p<0.01$  diferencias significativas con respecto al día 1 de ese grupo; \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.0001$  diferencias significativas con respecto a grupos control, # $p<0.001$  diferencias significativas entre genotipos.

Para entender a qué se debía la disminución observada en la respuesta locomotora, hicimos un análisis de la velocidad promedio de locomoción de los animales durante el primer día de habituación y no observamos diferencias significativas entre los distintos grupos (Figura 6a). Entonces, analizamos el número de eventos ambulatorios promedio durante los días de habituación, es decir, la cantidad promedio de veces que los ratones de un genotipo inician movimientos. Los resultados mostraron que los ratones que carecen de receptores D2 inician movimientos un menor número de veces y esta disminución es significativamente más marcada cuando la pérdida de receptores se da en la adultez, como en el caso de los ratones ind*Drd2*KO + tam (Figura 6a). La cantidad de eventos ambulatorios comparada con los grupos control oscila entre el 55 y el 75 % para ratones *Drd2*KO según el día de habituación, mientras que los ratones mutantes inducibles el primer día de habituación muestran el 30 % de actividad con respecto a los controles y, a medida que transcurren los días, este valor disminuye hasta alcanzar el 15 % en el día 3.



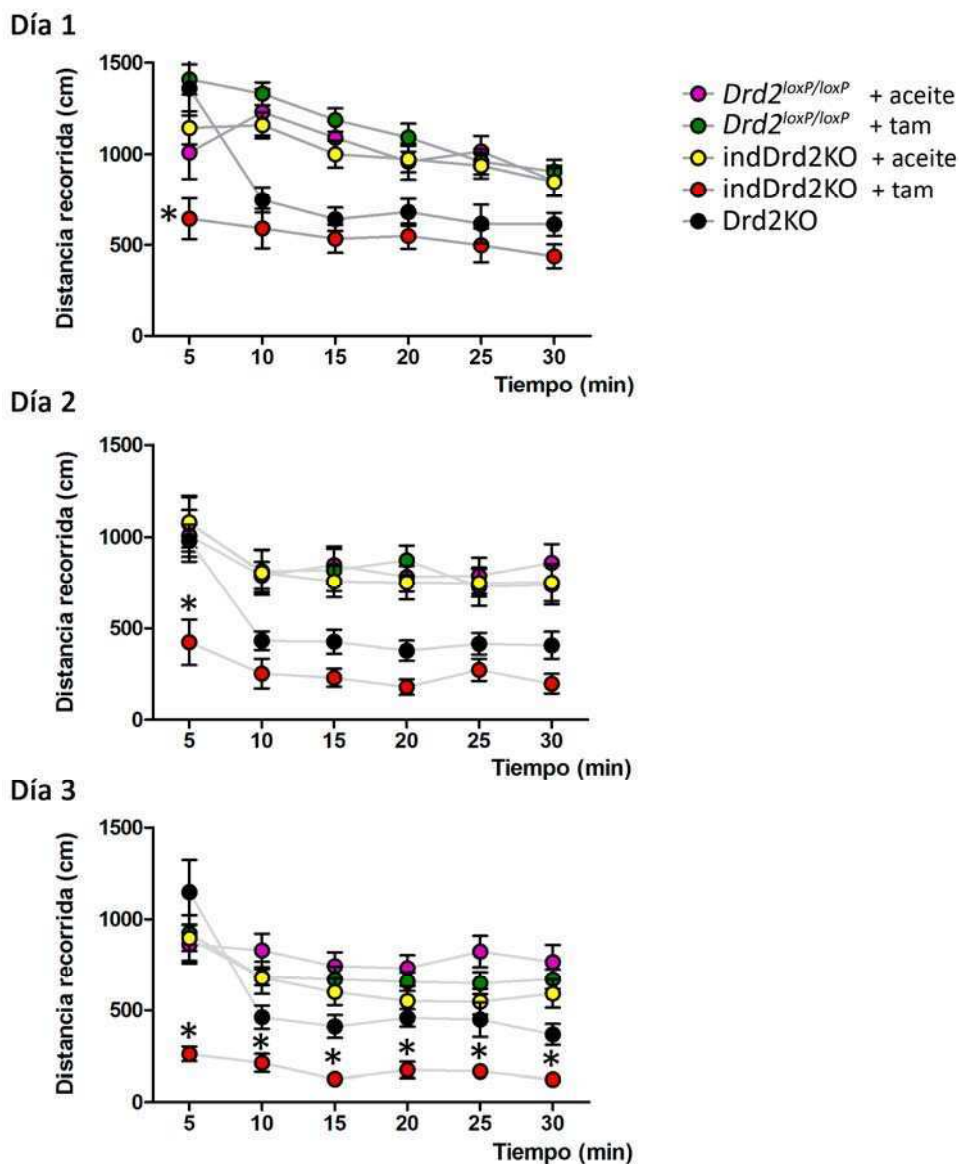


**Figura 6. Parámetros locomotores.** **a.** Se muestra la velocidad promedio en cm/s para cada uno de los grupos durante el primer día de locomoción espontánea. ANOVA de 1 vía.  $F(4,56)=1,19$ ,  $p=0,33$ . **b.** Se muestra la cantidad de veces que los ratones inician movimientos durante los primeros 30 min en cajas de actividad en los 3 días de habituación. ANOVA de Medidas Repetidas. Genotipo:  $F(4,55)=11,64$ ,  $p<0,00001$ . Días:  $F(2,110)=59,73$ ,  $p<0,0001$ . Interacción:  $F(8,110)=1,90$ ,  $p=0,067$ . Análisis *post hoc* de Fisher: \* $p<0,05$  con respecto a día 1 de ese genotipo; \*\* $p<0,05$  y \*\*\* $p<0,00001$  diferencias con respecto a los controles; # $p<0,01$  diferencias entre genotipos.

En los modelos previamente publicados de ratones mutantes nulos para el receptor D2, se describió que las diferencias más marcadas se observaron en los primeros 5 min de locomoción espontánea, un momento en donde el nuevo escenario representa una novedad (Boulay *et al.*, 1999). Para evaluar el efecto de la novedad en la respuesta motora analizamos la actividad locomotora en intervalos de 5 minutos (Figura 7).

Los ratones *Drd2*KO muestran niveles de actividad similares a los controles durante los primeros 5 min, pero luego su actividad locomotora disminuye de manera significativa. Cuando entran al día siguiente nuevamente en las cajas de actividad, ésta ya no es novedosa, pero todavía muestran una actividad exploratoria normal durante los primeros 5

min que después decae rápidamente.



**Figura 7. Habitación durante 30 min.** Se muestra la locomoción espontánea en cada uno de los días de habituación graficada en intervalos de tiempo cada 5 min. ANOVA de Medidas Repetidas para cada día. **Día 1:** Genotipo:  $F(4,55)=11,54$ ,  $p<0,0001$ ; Tiempo:  $F(5,275)=24,33$ ,  $p<0,001$ ; Interacción:  $F(20,275)=4,32$ ,  $p<0,0001$ . **Día 2:** Genotipo:  $F(4,53)=10,21$ ,  $p<0,0001$ ; Tiempo:  $F(5,265)=27,90$ ,  $p<0,001$ ; Interacción:  $F(20,265)=1,90$ ,  $p<0,05$ . **Día 3:** Genotipo:  $F(4,54)=13,81$ ,  $p<0,0001$ ; Tiempo:  $F(5,270)=19,41$ ,  $p<0,0001$ ; Interacción:  $F(20,270)=3,48$ ,  $p<0,0001$ . Análisis *post hoc* de Fisher. \*diferencias significativas con respecto a todos los demás grupos.

Por otro lado, los ratones indDrd2KO tratados con tamoxifeno, siempre muestran niveles de actividad locomotora muy bajos, incluso durante los primeros 5 min. A medida que transcurren los 30 min, la actividad de los ratones Drd2KO se asemeja a la de los ratones indDrd2KO tratados con tamoxifeno. Al tercer día, la locomoción de los mutantes

inducidos está muy disminuida y es significativamente menor incluso que la de los ratones Drd2KO durante los 30 min.

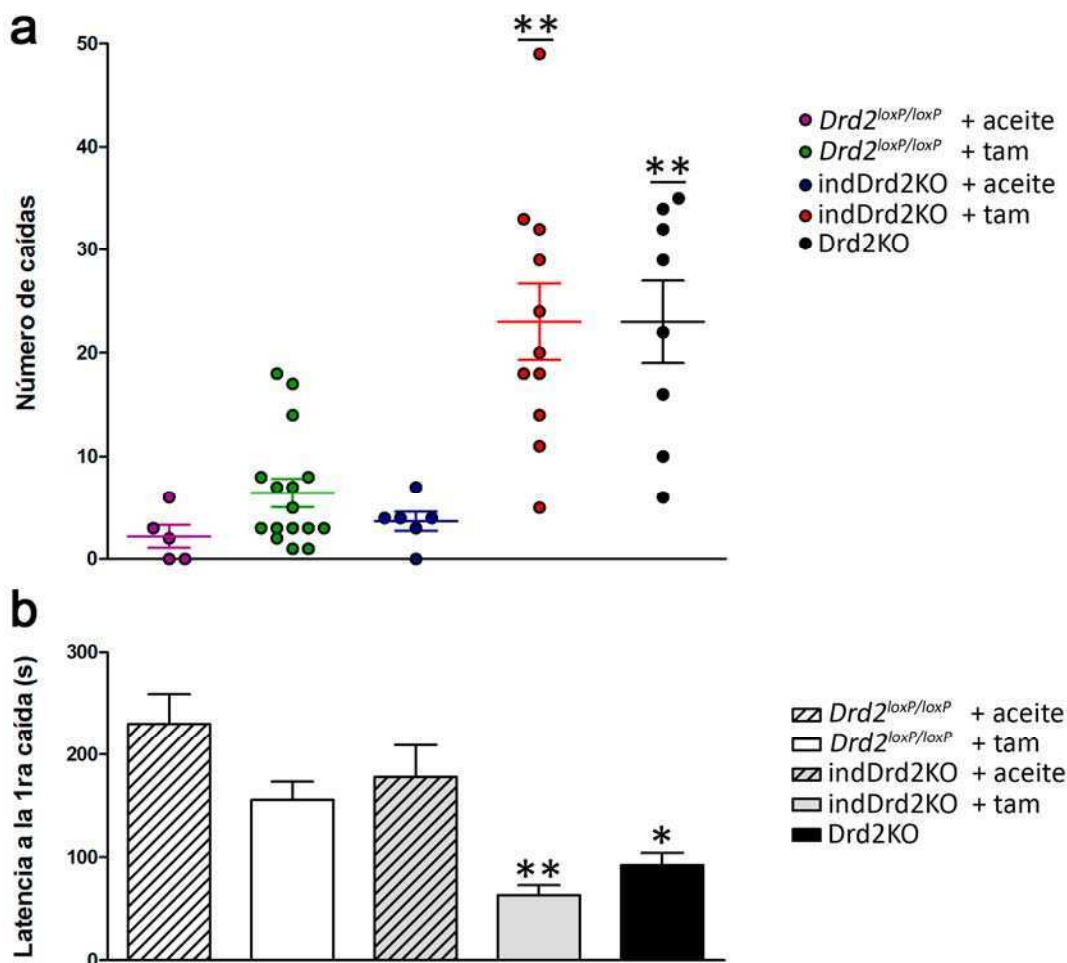
### **Análisis de la coordinación motora**

Con el objeto de evaluar la adquisición de habilidades motoras, ratones de los distintos grupos fueron colocados sobre una barra giratoria (*rotarod*). Utilizamos un esquema de velocidad fija de 16 rpm durante 180 s y registramos el número de caídas en ratones sin entrenamiento previo sobre un *rotarod*.

Los resultados obtenidos muestran que tanto los ratones indDrd2KO tratados con tamoxifeno, como los Drd2KO tienen mayores dificultades para mantenerse sobre el *rotarod* que los ratones control (Figura 8a). Ambos grupos muestran un mayor número de caídas en comparación con el resto de los grupos control sin mostrar diferencias entre sí.

A continuación, los mismos ratones fueron colocados en un programa de aceleración constante donde la velocidad pasa de 4 rpm a 40 rpm en 5 minutos y registramos la latencia a la primera caída. En esta prueba, los grupos indDrd2KO + tam y Drd2KO muestran latencias significativamente menores a la del resto de los grupos (Figura 8b) indicando problemas de coordinación motora.

Estos resultados mostraron que ratones que carecen de receptores D2 presentan menor locomoción y una coordinación motora deteriorada. Estas características se observan de manera más marcada en ratones que se desarrollaron normalmente y, una vez adultos, pierden un gran número de receptores D2.



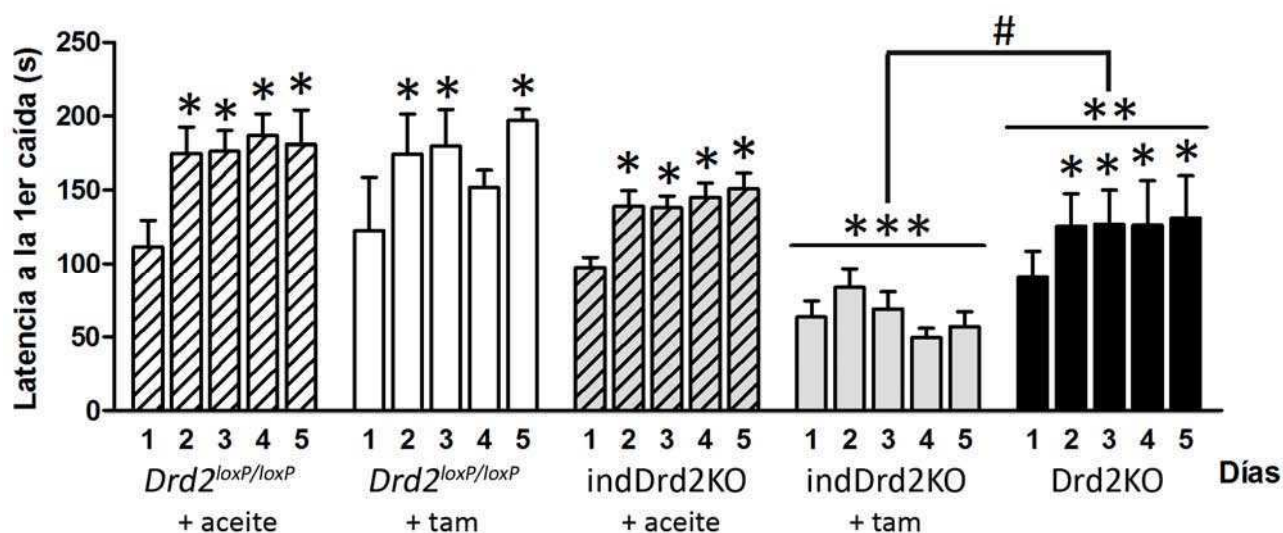
**Figura 8. Coordinación motora sobre el *rotarod*.** **a.** Se muestra el número de caídas en el *rotarod* de cada ratón en un programa de velocidad fija de 16 rpm. ANOVA de 1 vía. Genotipo:  $F(4,41)=13,06$ ,  $p<0,001$ . Análisis *post hoc* de Fisher. Referencias: \*\*diferencias significativas con respecto a los grupos control. **b.** Se muestra la latencia a la primera caída sobre el *rotarod* en un programa de velocidad acelerada 4 – 40 rpm. ANOVA de 1 vía. Genotipo:  $F(4,41)=8,68$ ,  $p<0,0001$ . Análisis *post hoc* de Fisher. \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,001$  diferencias significativas con respecto a los grupos control.

### Entrenamiento intensivo sobre un *rotarod* en ausencia de receptores D2

Con el objetivo de estudiar si los D2R son importantes sólo en la etapa de aprendizaje de un nuevo comportamiento motor y/o también durante la ejecución de una tarea previamente aprendida, desarrollamos el siguiente experimento. Un nuevo grupo de ratones de cada genotipo, fue entrenado en un *rotarod* en un programa acelerado de 4 – 40 rpm durante 5 días consecutivos, con 3 intentos diarios, separados por al menos 10 minutos para cada ratón. Registramos las latencias a la primera caída de cada intento y luego promediamos las latencias de los 3 intentos diarios para cada ratón. Se muestran los

resultados obtenidos a lo largo de 5 días consecutivos.

Observamos que todos los grupos mejoran la latencia del primer día en los días sucesivos, excepto por los indDrd2KO tratados con tamoxifeno que no muestran ningún signo de aprendizaje (Figura 9). A diferencia de éstos, los ratones Drd2KO sí mejoran las latencias, aunque no llegan a mostrar un rendimiento tan alto como el resto de los grupos control. Los ratones indDrd2KO tratados con tamoxifeno muestran diferencias significativas tanto al ser comparados con los grupos control como con los Drd2KO.



**Figura 9. Aprendizaje motor sobre el rotarod.** Se muestra el promedio de latencias a la primera caída de cada día durante 5 días consecutivos en un programa de velocidad acelerada 4 – 40 rpm. Anova de Medidas Repetidas. Genotipo:  $F(4,34)=15,05$ ,  $p<0,0001$ . Aprendizaje:  $F(4,136)=10,38$ ,  $p<0,0001$ . Interacción:  $F(16,136)=1,52$ ,  $p=0,10$ . Análisis *post hoc* de Fisher. Referencias: \* $p<0,05$  diferencias significativas con respecto al día 1 de ese grupo; \*\* $p<0,05$ , \*\*\* $p<0,0001$  diferencias significativas con respecto a los grupos control; # $p<0,05$  diferencias significativas entre genotipos.

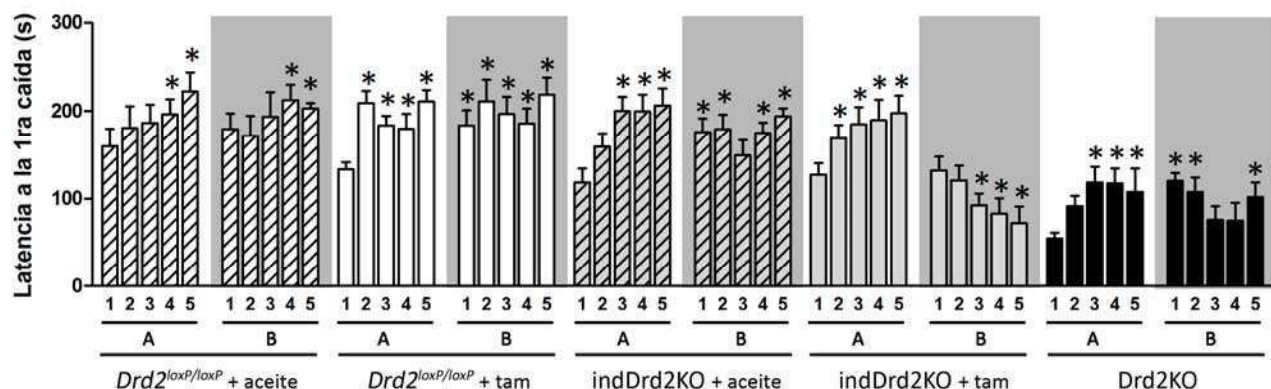
### Participación del D2R en la ejecución de conductas motoras

Para evaluar el rol del D2R en fases tardías del entrenamiento, es decir, durante respuestas automatizadas y habituales, realizamos un protocolo diferente en donde los ratones pierden los D2R luego de haber aprendido a mantenerse sobre el rotarod tan bien como los ratones control.

Para ello, entrenamos un nuevo grupo de ratones de 3 meses de edad durante 5 días sobre un rotarod a una velocidad acelerada 4 – 40 rpm con 3 sesiones por día y registramos las

latencias a la primera caída y los promedios de las latencias de cada día (etapa A). Finalizada la semana de aprendizaje, los ratones recibieron 1 inyección diaria de tamoxifeno de 50 mg/kg durante 10 días. Cuatro semanas después de la última inyección, reevaluamos la aptitud motora de todos los ratones en el mismo *rotarod* donde habían sido entrenados previamente (etapa B).

Los resultados muestran que todos los grupos de ratones aprenden a caminar durante los primeros 5 días de *rotarod*, aunque los *Drd2*KO tienen latencias más bajas que el resto de los grupos (Figura 10). En la etapa de reevaluación posterior a las inyecciones, todos los grupos mantuvieron las latencias alcanzadas al finalizar la primera semana de entrenamiento excepto los *indDrd2*KO que, durante los primeros dos días de la etapa B, mostraron valores similares a los del primer día de la etapa A pero luego, las latencias disminuyen progresivamente con el transcurso de los días (Figura 10).



**Figura 10. Rendimiento de entrenamientos prolongados sobre el *rotarod* antes y después del tratamiento con tamoxifeno.** Ratones de todos los grupos son entrenados durante 5 días consecutivos sobre el *rotarod* en un programa acelerado 4 - 40 rpm (A). Luego se inyectan durante 10 días con aceite o tamoxifeno según corresponda y la cuarta semana post inyecciones se vuelven a testear en el mismo esquema (B). Se muestra el número promedio de latencias por día para cada grupo. ANOVA de Medidas Repetidas. Genotipo:  $F(4,26)=5,44$ ,  $p<0,01$ . Aprendizaje por 10 días:  $F(9,234)=10,94$ ,  $p<0,0001$ . Interacción:  $F(36,234)=4,96$ ,  $p<0,0001$ . Análisis *post hoc* de Fisher. Referencias: \*diferencias significativas con respecto al día 1 de ese grupo.

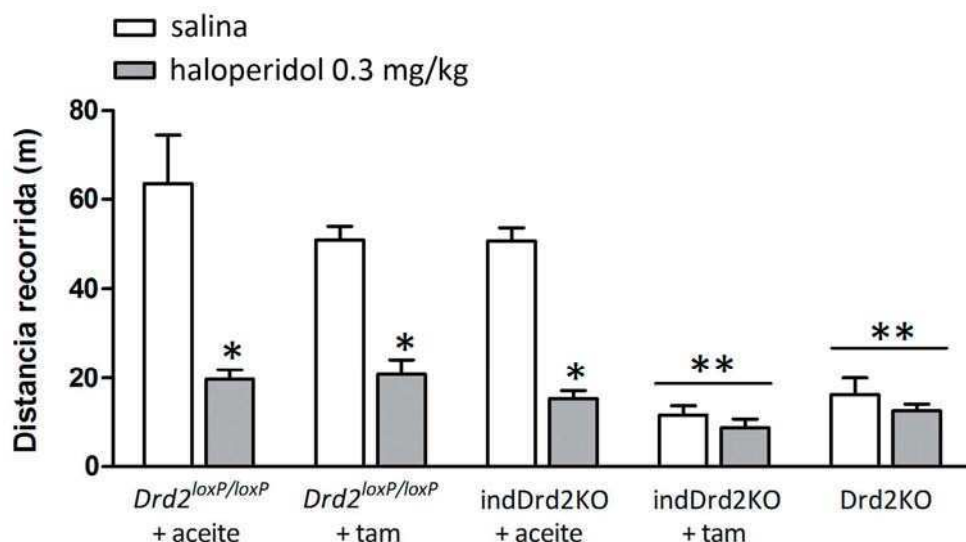
### Respuesta al haloperidol

A continuación, fue de interés evaluar la respuesta a agonistas y antagonistas de receptores dopaminérgicos para poder evaluar el compromiso locomotor de estos animales luego de la recombinación. El producto de la comparación con los ratones



mutantes nulos, nos podría indicar la verdadera contribución del receptor D2 en la respuesta a drogas.

Ratones tratados con aceite o tamoxifeno a los 3 meses de edad y ratones mutantes nulos fueron inyectados con solución salina o haloperidol 0.3 mg/kg y 20 minutos después se colocaron en cajas de actividad donde registramos la locomoción durante 30 min. Todos los ratones fueron inyectados de manera alternada con solución salina un día y la semana siguiente con haloperidol, o viceversa y promediamos los resultados por grupo según el tratamiento.



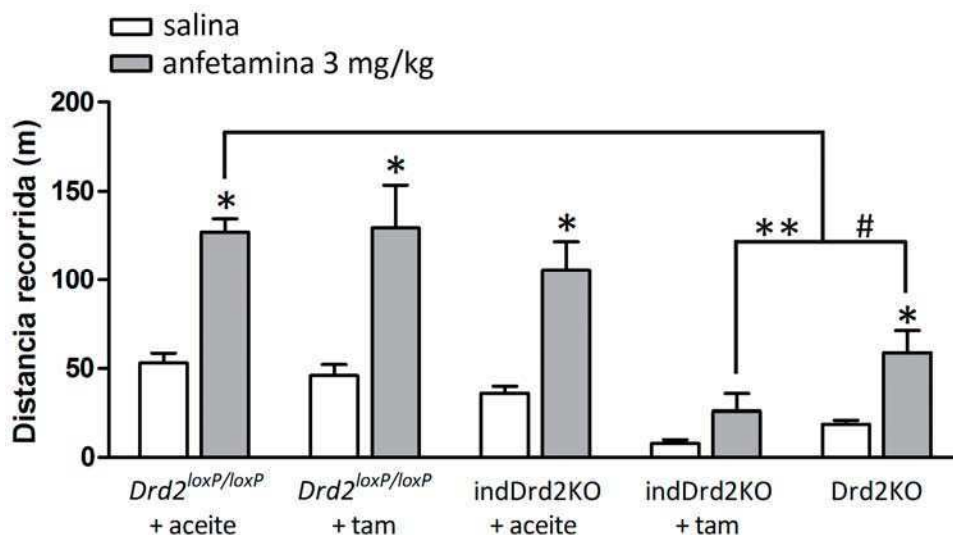
**Figura 11. Locomoción en respuesta al haloperidol.** Ratones de todos los grupos se inyectan con haloperidol 0.3 mg/kg o con solución salina; 20 min más tarde se colocan en cajas de actividad y se registra la actividad locomotora durante 30 min. Se compara la locomoción con la droga y el vehículo para cada grupo y entre grupos. ANOVA de Medidas Repetidas. Genotipo:  $F(4,25)=8,46$ ,  $p<0,001$ . Tratamiento:  $F(1,25)=45,64$ ,  $p<0,0001$ . Interacción:  $F(4,25)=4,83$ ,  $p<0,01$ . Análisis *post hoc* de Fisher. Referencias: \*diferencias significativas contra salina dentro de ese grupo; \*\*diferencias significativas entre genotipos contra los grupos control.

En los ratones control, observamos que la administración de haloperidol provoca una fuerte disminución en la locomoción (Figura 11). Los niveles que alcanzan los animales control con la administración de haloperidol se asemejan a los niveles locomotores de animales que carecen de receptores D2 inyectados con solución salina. La administración de haloperidol no tiene efecto significativo sobre la actividad locomotora de animales Drd2KO ni tampoco sobre ratones indDrd2KO tratados con tamoxifeno.

## Respuesta a la anfetamina

Para evaluar los efectos de anfetamina sobre la locomoción en ratones indDrd2KO tratados con tamoxifeno, ratones de todos los grupos fueron inyectados con salina o con anfetamina 3 mg/kg e inmediatamente colocados en cajas de actividad donde se registró su locomoción. Esta dosis de anfetamina fue elegida porque produce un notable efecto motor en ratones controles. Todos los ratones fueron inyectados de manera alternada el primer día con solución salina y el siguiente con anfetamina, o viceversa, en un esquema balanceado.

Observamos que la administración de 3 mg/kg de anfetamina provoca un fuerte aumento en la locomoción de ratones control (Figura 12). Como se había reportado previamente (Kelly *et al.*, 2008), la administración de anfetamina tiene efecto significativo sobre la actividad locomotora de animales Drd2KO. Sin embargo, esta dosis de anfetamina no modificó de manera significativa la locomoción de ratones indDrd2KO tratados con tamoxifeno.



**Figura 12. Locomoción en respuesta a la anfetamina.** Ratones de todos los grupos se inyectan con anfetamina 3 mg/kg o con solución salina e inmediatamente se colocan en un campo abierto y se registra la actividad locomotora durante 30 min. Se compara la locomoción con droga y vehículo para cada grupo y entre grupos. ANOVA de Medidas Repetidas. Genotipo:  $F(4,25)=5,86$ ,  $p<0,01$ . Tratamiento:  $F(1,25)=57,80$ ,  $p<0,0001$ . Interacción:  $F(4,25)=2,38$ ,  $p=0,08$ . Análisis *post hoc* de Fisher. Referencias: \*: diferencias significativas con respecto a salina; \*\* $p<0,05$ , \*\*\* $p<0,01$ : diferencias significativas contra los grupos control.



**Box 4**  
**Postura corporal en ausencia de D2R**

La postura corporal y la marcha de los ratones mutantes inducidos a los 3 meses de edad y la de los ratones *Drd2KO* no se diferencian de la de los ratones control. Sin embargo, cuando los ratones *indDrd2KO* recibieron tamoxifeno excepcionalmente a partir de los 6 meses de edad, observamos alteraciones muy marcadas en su postura corporal que fueron registradas en fotografías y videos (Figura 13). Cabe destacar que ratones de 3 meses de edad tratados paralelamente con las mismas soluciones de tamoxifeno nunca mostraron alteraciones posturales ni siquiera en edades avanzadas (>6 meses).

Los cambios posturales observados en los ratones tratados a partir de los 6 meses fueron acompañados de temblor en reposo. Los problemas posturales observados en algunos ratones son muy severos llegando a impedir la realización de movimientos simples. Por ejemplo, les impide caminar con naturalidad, los pasos son muy cortos, las patas avanzan muy cerca del cuerpo y la postura permanece en todo momento completamente encorvada. Los ratones *Drd2KO*, por el contrario, a pesar de ser hipolocomotores no presentan ningún problema postural, ni siquiera en edad avanzada (>6 meses).



**Figura 13. Postura corporal de ratones luego de la pérdida de D2R en edad avanzada. a.** Ratón *Drdz<sup>loxP/loxP</sup>* con tamoxifeno. **b-c.** Dos ratones *indDrd2KO* tratados con tamoxifeno.

## Conclusiones y Discusión

---

El objetivo del presente trabajo consistió en comparar las similitudes y diferencias entre (i) anular la expresión de *Drd2* desde los estadios más tempranos del desarrollo embrionario e (ii) inducir la ablación genética en ratones adultos de manera de evitar el desarrollo de compensaciones plásticas que ocurren mayormente en etapas embrionarias.

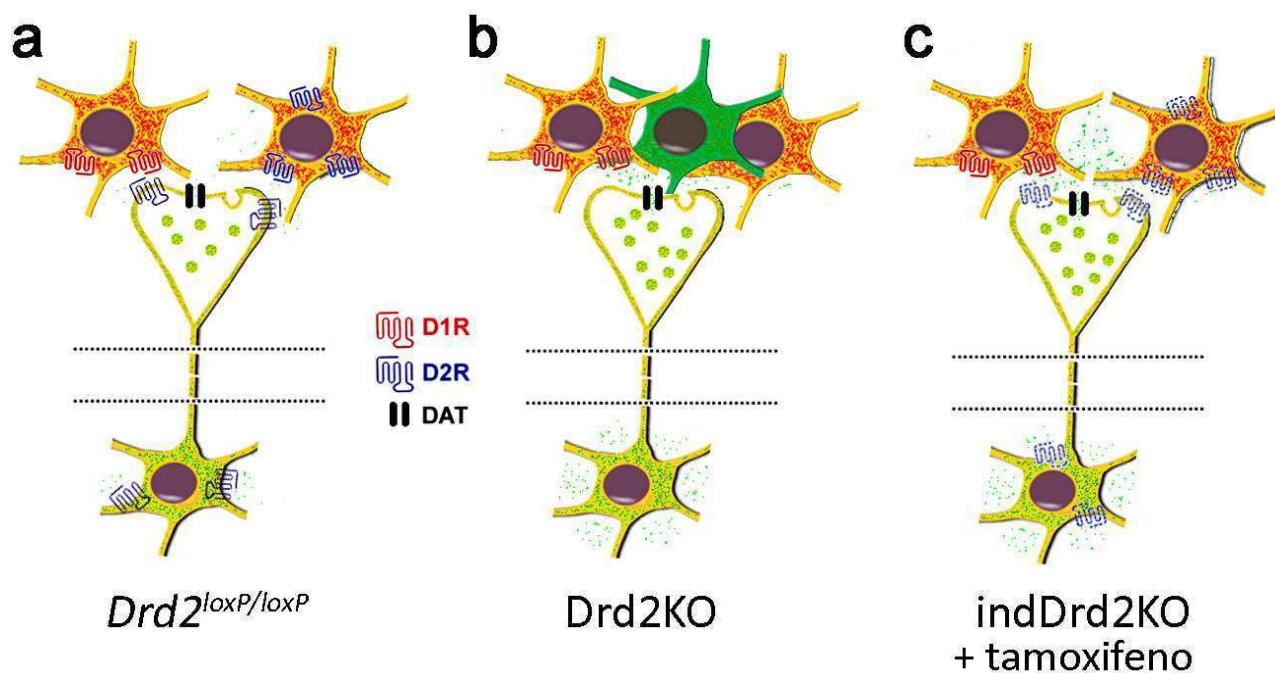
En los últimos 30 años se han publicado numerosos trabajos que estudian las funciones de la dopamina y la señalización a través de sus distintos receptores. Nosotros generamos un modelo nuevo que permite eliminar la expresión generalizada de *Drd2* de manera controlada en el tiempo. Los resultados de estudios preliminares de expresión de D2R y la falta de respuesta al haloperidol observados en estos ratones mutantes inducidos indican que el grado de recombinación alcanzado es muy alto y, por lo tanto, el patrón de respuesta observado frente a este antagonista es semejante al observado en ratones *Drd2*KO.

Coincidentemente con otros modelos de ratones deficientes en D2R (Baik *et al.*, 1995; Kelly *et al.*, 1998 y Jung *et al.*, 1999), los ratones *indDrd2*KO inducidos mostraron parámetros reducidos de actividad locomotora con una disminución significativa en la distancia recorrida, número de movimientos iniciados en un intervalo de tiempo y conducta exploratoria en ambientes novedosos, manteniendo una velocidad de locomoción normal. Sin embargo, la reducción observada en los distintos parámetros fue significativamente más marcada que en ratones *Drd2*KO constitutivamente deficientes en D2R. Esta reducción era esperable ya que la falta de D2R en las NEMs estriatales de la vía indirecta (Gerfen *et al.*, 1990; Hersch *et al.*, 1995; Yung *et al.*, 1995) conducirá a un aumento exacerbado de la actividad de la vía impidiendo el movimiento. Además, algunos trabajos sostienen que la NEMs estriatopálidas ejercen un efecto facilitatorio sobre las NEMs estriatonigrales ya sea directa o indirectamente a través de la acción de interneuronas (Sano, *et al.*, 2003; Tunstall *et al.*, 2002).

Otra de las alteraciones que ocurren en ratones que carecen de D2R y que podrían estar contribuyendo a la disminución observada en el movimiento es la desregulación de la plasticidad sináptica en las sinapsis estriatales (Kreitzer y Malenka, 2008). En este nuevo modelo la recombinación mediada por el tamoxifeno se produce en forma ubicua, por lo

tanto, estaríamos delecionando también los D2R presentes en interneuronas colinérgicas (Aubry *et al.*, 1993). Se considera que la acetilcolina funciona suprimiendo la actividad locomotora señalizando a través de receptores muscarínicos y antagonizando las acciones de dopamina al inhibir las NEMs estriatonigrales y estimular las NEMs estriatopálidas (Di Chiara *et al.*, 1994; Wang y McGinty, 1997; Kaneko *et al.*, 2000). La inducción de LTD en el estriado depende de la estimulación dopaminérgica que está mediada a través de D2R localizados en interneuronas colinérgicas (Wang *et al.*, 2006) y juega un rol fundamental en la disminución de la actividad de la vía indirecta favoreciendo el movimiento. En situaciones de depleción de dopamina, los protocolos que antes inducían LTD ahora inducen LTP (Kreitzer y Malenka, 2007; Shen *et al.*, 2008). Este cambio podría estar contribuyendo en gran medida a la hiperactividad de la vía indirecta. Por lo tanto, la falta de D2R en estas interneuronas contribuiría a una hiperactividad en esta vía perjudicando la ejecución de movimientos (Kreitzer y Malenka, 2008).

A pesar de que el primer trabajo que publicó un modelo de ratones mutantes deficientes en D2R fue presentado como un modelo de Parkinson (Baik *et al.*, 1995), las observaciones realizadas en dichos animales no se correlacionaron verdaderamente con los rasgos característicos de esta enfermedad (bradiquinesia, temblor y rigidez; Clifford *et al.*, 2000, 2001). La comparación entre las respuestas observadas en ratones mutantes inducibles y ratones mutantes constitutivos para el D2R, demostró que la ausencia de un gen funcional puede ser compensada por programas alternativos más fácilmente durante las primeras etapas del desarrollo y que estas compensaciones no son tan exitosas cuando la mutación nula se produce en ratones adultos desarrollados normalmente (Figura 14). Esta diferencia generó fenotipos más severos en el modelo inducible incluso cuando la pérdida de los D2R no alcanzó el 100 %.



**Figura 14. Esquema comparativo de las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio de ratones  $Drd2^{loxP/loxP}$ ,  $Drd2KO$  e  $indDrd2KO$  tratados con tamoxifeno.** **a.** Esquema de un ratón control, donde los D1R se representan en color rojo y los D2R en color azul. La dopamina liberada se representa con puntos verdes. **b.** La ausencia de D2R en ratones  $Drd2KO$  conduce a la aparición de programas alternativos de desarrollo que compensan la falta del receptor desde etapas embrionarias, dando como resultado ratones con circuitos considerablemente diferentes a los de ratones control  $Drd2^{loxP/loxP}$  (las compensaciones se representan con la neurona verde). **c.** La eliminación de D2R inducida durante la vida adulta (esquemática por los D2R con líneas punteadas) evita la aparición de compensaciones en el circuito, de manera que los ratones que resultan de este proceso son muy similares a ratones control y solamente se diferencian en la ausencia del D2R en estudio.

La ocurrencia de compensaciones explica el por qué no se evidencia un estado de catatonia espontánea en mutantes del D2R clásicos tal como se observa en ratones normales tratados con antagonistas de D2R (Kelly *et al.*, 1998). También, la diferencia en la respuesta a anfetamina observada entre los distintos mutantes inducidos y constitutivos evidencia la ocurrencia de compensaciones. Ratones mutantes  $indDrd2KO$  inducidos no respondieron a la administración de anfetamina de manera significativa, mientras que ratones  $Drd2KO$  mostraron un aumento en la locomoción. De todas maneras, la locomoción observada en ratones  $Drd2KO$  con anfetamina fue inferior que la alcanzada por ratones  $Drd2^{loxP/loxP}$  en las mismas condiciones; sin embargo, ésta superó los niveles de actividad de ratones control en ausencia de droga. Esta disminución coincide con trabajos anteriores que observan la respuesta a metanfetamina en ratones *knockout* para el D2R

(Kelly *et al.*, 2008). Nuestros resultados demuestran que la estimulación de D1R no es suficiente para provocar un aumento significativo en la locomoción, incluso cuando los niveles de liberación de dopamina probablemente estén aumentados, según los resultados encontrados en el Capítulo 1 (Bello *et al.*, 2011; L'Hirondel *et al.*, 1998). Estos resultados son consistentes con estudios anteriores que demuestran la importancia de la estimulación simultánea de receptores D1 y D2 para lograr un balance que permita una actividad locomotora normal (LaHoste *et al.*, 1993; Gerfen *et al.*, 1995; Keefe y Gerfen, 1995; Kravitz *et al.*, 2010). De esta manera, los ratones indDrd2KO inducidos podrían constituir un modelo donde estudiar la importancia de la regulación mediada por las vías directa e indirecta de los ganglios basales (Alexander y Crutcher, 1990; DeLong, 1990; Graybiel, 2008; Kravitz *et al.*, 2010).

Durante la generación de ratones mutantes condicionales para el D2R, nuestro laboratorio obtuvo paralelamente una nueva cepa de ratones *knockout* (no condicionales) del gen *Drd2*, los ratones *Drd2*KO que, al igual que los descritos anteriormente (Kelly *et al.*, 1997), son enanos y tienen curvas de peso menores que los ratones de tipo salvaje, de manera que son distinguibles a simple vista. A pesar de su tamaño, no presentan alteraciones locomotoras evidentes, ni alteraciones en la marcha ni en la postura. Sus niveles de actividad locomotora están disminuidos si se comparan con ratones control pero esta reducción, si bien es significativa, es moderada. A diferencia de modelos anteriores donde las diferencias en la locomoción más importantes se observaron durante los primeros 5 min de habituación (Baik *et al.*, 1995; Kelly *et al.*, 1998; Clifford *et al.*, 2000, 2001), nosotros encontramos que los ratones *Drd2*KO se comportan de igual manera que ratones *Drd2*<sup>loxP/loxP</sup> y las diferencias se encuentran en los minutos siguientes y se mantienen hasta, por lo menos, 25 minutos después. Sin embargo, a diferencia de los ratones *Drd2*KO, los ratones ind*Drd2*KO inducidos muestran una disminución muy marcada durante los primeros 5 minutos de habituación con respecto a los grupos control e incluso con los mismos *Drd2*KO. Es difícil discernir si los déficits locomotores de los ratones mutantes inducidos se deben a un fenómeno puramente motor o también existe un componente motivacional que está influyendo en el comportamiento. El hecho de que mayores diferencias se observen en los primeros minutos sugiere que éste potencial componente motivacional esté jugando un papel relevante.

Si bien la locomoción es una tarea compleja y finamente controlada, la sola pérdida de estos receptores, a pesar de mantener intactas las neuronas que los expresan, induce déficits motores severos. El momento en que se produce la ablación de los D2R es fundamental. A la hora de elaborar conclusiones con respecto a la función de los D2R, la observación del comportamiento de los ratones *Drd2KO* podría llevarnos por caminos erróneos y a determinar que los D2R son necesarios pero no imprescindibles para la coordinación motora sobre un *rotarod*. De hecho, en el trabajo de Kelly et al. (1998) se vio que ratones mutantes nulos aprenden esta tarea tan bien como ratones control a pesar de que tardan más días en alcanzar el mismo rendimiento. La nueva comparación con ratones mutantes inducidos nos indica que los D2R son claves para una normal coordinación motora y para el correcto aprendizaje de una tarea motora como el *rotarod* ya que su pérdida durante la vida adulta es suficiente para impedir la correcta ejecución de una tarea motora que se realiza por primera vez.

Nuestros resultados demuestran que la falta de receptores ya en etapas embrionarias induce el desarrollo de ratones cuyos déficits son moderados y, a pesar de carecer de D2R, pueden superar esta falta y aprender y mejorar en sus habilidades motoras. Si estos receptores se pierden en edades adultas, los déficits son más severos y no les es posible aprender nuevas tareas motoras como se observa en ratones *indDrd2KO* inducidos, incluso a pesar de tener todavía D2R remanentes, neuronas dopaminérgicas y NEMs estriatales presentes.

La falta de D2R dificulta la ejecución de tareas tanto *orientadas a objetivos* como de *hábitos* (Yin et al., 2009). Las compensaciones que surgen en ratones mutantes nulos constitutivos para el D2R enmascaran posibles funciones de estos receptores. Es por eso que consideramos que este nuevo modelo sería más apropiado para el estudio preciso de las funciones de los D2R. Observamos que el desempeño de una tarea motora ya aprendida en ausencia de D2R es muy bajo. Esto es consistente con resultados obtenidos con la administración de haloperidol a ratones normales (Yin et al., 2009; Costa et al., 2004). Estos resultados confirman que, además de ser importante para el aprendizaje de una tarea motora como caminar sobre una barra en movimiento que requiere en sus comienzos de atención consciente, sostenida y de conductas *orientadas al objetivo* particular, los D2R también son fundamentales para ejecutar una tarea previamente aprendida, es decir, un

comportamiento que ya constituía previamente un *hábito*.

El perfil de rendimiento sobre *rotarod* a lo largo de los días en la segunda etapa posterior al tratamiento de los ratones mutantes inducidos, es muy llamativo. Los ratones no mantienen sus bajos niveles de desempeño de manera estable, sino que disminuyen progresivamente las latencias a lo largo del entrenamiento (Figura 10). Esto podría explicarse si hubiera una disminución progresiva en la cantidad de receptores remanentes por seguir teniendo efecto el tamoxifeno luego de las inyecciones. Si este fuera el caso, también hubiéramos observado una disminución progresiva cuando los ratones se entrenaban en los esquemas anteriores (Figura 9), situación que no ha sido observada. Probablemente exista un componente motivacional que lleve al abandono de la resolución de la tarea motora en los ratones que pierden los receptores luego del entrenamiento sino podrían mostrar un desempeño motor mayor al que presentan o tan sólo mantener el rendimiento que muestran durante los primeros días de la etapa B. La marcada disminución en los niveles motivacionales podría explicar el menor rendimiento motor alcanzado, especialmente si consideramos que los niveles de actividad locomotora no están determinados únicamente por componentes motores sino también por factores motivacionales debido a que la estimulación dopaminérgica señala estos dos aspectos de la locomoción mediando respuestas de refuerzo y seleccionando patrones conductuales motores simultáneamente (McClure *et al.*, 2003)

Nuestro modelo presenta algunas características relacionadas con la enfermedad de Parkinson como hipoquinesia y, en algunos casos, puede llevar a rigidez y temblor en reposo (**Box 4**), pero no se asemeja etiológicamente a un modelo de Parkinson, ya que no sólo tiene intacta la cantidad de neuronas dopaminérgicas sino que probablemente tenga niveles aumentados de liberación de dopamina por tener deletionados los autorreceptores. El tratamiento clínico con antipsicóticos típicos como el haloperidol, suelen acompañarse de efectos secundarios motores extrapiramidales (Chetrit *et al.*, 2009). Estos efectos se cree que se deben a que los antipsicóticos son bloqueantes de los receptores dopamina "tipo D2" (Ban y Lehmann, 1974; Richelson, 1984). Probablemente, la pérdida de D2R en ratones adultos se asemeje a un modelo de bloqueo crónico de D2R, como sucede en el caso de pacientes esquizofrénicos que reciben neurolépticos diariamente. Las características propias del modelo, lo asemejan más bien a un modelo de parkinsonismo inducido por antipsicóticos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales y Bioterio

#### Generación de líneas de ratones mutantes

Los ratones de la línea  $Drd2^{loxP/loxP}$  y  $Drd2KO$  se generaron en nuestro laboratorio en un *background* genético híbrido (C57Bl/6J x 129) y se retrocruzaron por 10 generaciones con la cepa pura endocriada C57Bl/6J obtenida de Jackson Laboratories.

Los ratones  $Dat^{+/iresCre}$  fueron donados por Christina Bäckman en un *background* genético mixto ya retrocruzado por 4 generaciones con ratones de cepa pura C57Bl/6J. Fueron posteriormente retrocruzados por 6 generaciones más con ratones  $Drd2^{loxP/loxP}$  en n=10, obteniéndose así ratones autoDrd2KO.

Los ratones CMV-Cre.ER<sup>TM</sup> fueron comprados a *Jackson Laboratories* (B6.Cg-Tg(CAG-cre/Esr1\*)5Amc/J) en un n de retrocruza de 5 y fueron posteriormente retrocruzados por 5 generaciones más con ratones  $Drd2^{loxP/loxP}$  en n=10.

Las dos líneas de ratones que expresaban *Cre* fueron retrocruzadas de manera independiente con ratones de cepa pura C57Bl/6J hasta homogeneizar su fondo genético en un 99 % C57Bl/6J.

#### Mantenimiento de los ratones

Los animales se mantuvieron en jaulas grupales o de cría hasta su utilización para experimentos neuroquímicos, o bien fueron aclimatados durante al menos 3 días en la sala de conducta, antes del comienzo de los experimentos conductuales.

Tanto en el bioterio como en la sala de conducta, los animales se mantuvieron con un sistema de ventilación permanente, un ciclo de luz/oscuridad de 12 h (las luces se prenden a las 7 am) y una temperatura controlada de entre 19 y 23 °C. Los ratones recibieron una dieta comercial de mantenimiento, agua potable y fueron siempre alimentados *ad libitum*, a menos que se indique lo contrario. Todos los experimentos se realizaron entre las 11 pm y las 18 pm. Todos los experimentos se realizaron en machos y algunos también en hembras. Solamente se muestran los resultados obtenidos para los machos, excepto que se indique lo contrario.



## Genotipificación de los animales de las diferentes colonias

### Extracción de ADN

Al momento del destete (21 días post-nacimiento, P21), las crías se numeran con marcas en las orejas. Utilizando un sacabocado, se extrae un pequeño fragmento de tejido de la oreja que se procesa para extraer el ADN para su genotipificación. Luego el tejido se incuba con 120  $\mu$ l de buffer colas y proteinasa K (1,3 mg/ml, INVITROGEN) y se las deja procesando durante 3 horas, por lo menos, y con agitación a 55 °C. Después de la digestión, se agrega una solución de acetato de potasio que facilita la precipitación de las proteínas. Se incuban en hielo 5 min y se centrifugan a velocidad máxima durante 15 min. Se recupera el sobrenadante en un tubo nuevo y se precipita el ADN con 2-propanol durante la noche (O.N.). Al día siguiente, se centrifugan las muestras durante 10 min a velocidad máxima y se recupera el *pellet*. Se lavan con etanol al 70 %, se centrifugan 5 min y se dejan secar. Se resuspende el ADN en buffer TE (composición) durante 10 min a 55°C. Luego se procede a la genotipificación por reacción de PCR.

### Reacciones de PCR con *primers* específicos

Dependiendo del gen de interés a detectar se realizan distintas reacciones de PCR. Los volúmenes de reacción son de 20  $\mu$ l y se utilizaron *primers* obtenidos de distintos proveedores, según la época (SIGMA, Invitrogen, Genbiotech). Finalmente, se realiza la electroforesis de los productos de PCR en geles de agarosa de 1.5-2 % en TBE (buffer).

### Para detectar los alelos *Drd2*<sup>+</sup>, *Drd2*<sup>oxP</sup>, o *Drd2*<sup>-</sup>:

**Reacción:** ADN 100 – 200 ng; *Primer* Type I 1,25  $\mu$ M; *Primer* Type II 1,25  $\mu$ M; *Primer* Type I&II 2,5  $\mu$ M; dNTPs (Invitrogen) 200  $\mu$ M; Buffer PCR (Invitrogen) 1x; MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen) 3 mM; Taq Pol (INV.) 3 U.

#### ***Primers:***

Type I: TGCAAGACTGCATCATCCTC

Type II: TGCTCAACACACTCACATGC

Type I&II: GCATTTGGAGCAACTGGAAT

Ciclado: **1)** 94 °C durante 5 min; **2)** 94 °C durante 30 s; **3)** 67 °C durante 30 s, – 1°C/ciclo; **4)** 72 °C durante 1 min; **5)** ir al paso 2) 14 veces; **6)** 94°C durante 30 s; **7)** 52°C durante 30 s; **8)**

72 °C durante 1 min **9)** ir al paso 6) 14 veces; **10)** 72°C durante 5 min. Rampa de calentamiento (slope) S8.

**Productos:** banda alelo  $Drd2^+$  230 pb; banda alelo  $Drd2^{loxP}$  370 pb; banda alelo  $Drd2^-$  453 pb.

**Para detectar el alelo  $Dat^{IresCre}$ .**

**Reacción:** ADN 100 – 200 ng; *Primer* Datcre ex15 F 1,25 μM; *Primer* Datcre ex15 R 1,25 μM; *Primer* IRES reverse 2,5 μM; dNTPs (Invitrogen) 200 μM; Buffer PCR (Invitrogen) 1x; MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen) 2,5 mM; Taq Pol (INV.) 3 U.

***Primers:***

Datcre ex15 F: 5' TGGCTGTTGGTGTAAGTGG 3'

Datcre ex15 R: 5' GGACAGGGACATGGTTGACT 3'

IRES reverse: 5' CCAAAGACGGCAATATGGT 3'

**Ciclado:** **1)** 94 °C durante 4 min; **2)** 95 °C durante 30 s; **3)** 60 °C durante 30 s; **4)** 72 °C durante 30 s; **5)** ir al paso 2) 34 veces; **6)** 72 °C durante 5 min. Rampa de calentamiento (slope) S8.

**Productos:** banda alelo  $Dat^+$  264 pb; banda alelo  $Dat^{IresCre}$  152 pb.

**Para detectar el alelo Cre-ER<sup>TM</sup>.**

**Reacción:** ADN 100 – 200 ng; *Primer* TAMCRE F 1,25 μM; *Primer* TAMCRE R 1,25 μM; dNTPs (Invitrogen) 200 μM; Buffer PCR (Invitrogen) 1x; MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen) 2,5 mM; Taq Pol (INV.) 2 U.

***Primers:***

TAMCRE F: 5' AACCTGGATAGTGAAACAGGGGC 3'

TAMCRE R: 5' TGAACCAGCTCCCTATCTGC 3'

**Ciclado:** **1)** 94 °C durante 4 min; **2)** 95 °C durante 30 s; **3)** 62 °C durante 30 s; **4)** 72 °C durante 30 s; **5)** ir al paso 2) 34 veces; **6)** 72 °C durante 5 min. Rampa de calentamiento (slope) S8.

**Producto:** banda alelo CreER<sup>TM</sup> 400 pb.

**Para detectar EGFP:**

**Reacción:** ADN 100 – 200 ng; *Primer* α-S2 2,5 μM; *Primer* S3 2,5 μM; dNTPs (Invitrogen) 200 μM; Buffer PCR (Invitrogen) 1x; MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen) 3 mM; Taq Pol (INV.) 2 U.

**Primers:**

$\alpha$ -S2: 5' GTGTTCTGCTGGTAGTGGT 3'

S3: 5' ATCGACTTCAAGGAGGACG 3'

**Reacción:** **1)** 94 °C durante 4 min; **2)** 95 °C durante 5 s; **3)** 58 °C durante 10 s; **4)** 72 °C durante 20 s; **5)** ir al paso 2) 24 veces; **6)** 72 °C durante 5 min. Rampa de calentamiento (slope) S8. En capilares.

**Preparación y procesamiento de tejidos****Perfusión**

Los tejidos se fijan mediante perfusiones intracardíacas clásicas. Brevemente, los animales son anestesiados utilizando avertina (2,2,2-tribromoetanol, Aldrich) 200 mg/kg en NaCl 0,9%. Una vez anestesiados, se expone el corazón, se realiza una incisión en la aurícula derecha y entrando con un catéter por el ventrículo izquierdo se perfunden primero 10-15 ml de NaCl 0,9% y luego 15-25 ml de una solución de paraformaldehído (PFA) 4% en PBS. Los tejidos de interés son disecados inmediatamente y continúan el proceso de fijación en PFA 4% a 4°C, durante toda la noche en el caso de los cerebros y pituitarias.

**Obtención de secciones en vibrátomo**

Los cerebros perfundidos e incubados durante 12-14 horas en PFA 4% a 4°C, se lavan en KPBS (16,4 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 3,6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 154 mM NaCl) frío durante 5 min para eliminar el exceso de PFA. Seguidamente, se coloca el cerebro en un molde y se recorta según la zona de interés, en forma sagital o coronal, según corresponda. Generalmente, los cerebros son incorporados en un taco de agarosa 1,5-2 % para facilitar su seccionamiento. Se monta el espécimen sobre la platina del equipo (Vibratome) y una vez adherida a la base con adhesivo sintético de secado rápido ("La Gotita", Poxipol), se la cubre con KPBS frío y se coloca la platina en el equipo rodeada de hielo. Utilizando media hoja de afeitar (Platinum Plus, Gillette) se realizan cortes coronales o sagitales de 50-80  $\mu$ m de espesor. Las secciones flotantes son recolectadas en una placa de 24 pocillos conteniendo KPBS frío y utilizadas inmediatamente o congeladas en medio de congelación de tejidos (TFM, 30 % etilenglicol, 30 % glicerol en PBS).

### **Obtención de secciones en crióstato**

Se pueden obtener cortes de tejido a partir de cerebros de animales previamente perfundidos o no, según el experimento. La muestra se monta sobre la platina del equipo (MicroM, modelo: HM 505 N) y se generan cortes coronales o sagitales de 20 mm de espesor. Las secciones son montadas en portaobjetos Superfrost Plus (Fisher). Finalmente, los vidrios se secan durante 30 min al aire y se guardan a -70°C hasta su posterior utilización.

### **Hibridación in situ con ribosondas radioactivas**

#### *Obtención del vector pRiboD2E2*

A partir de un plásmido generado por el Dr. Diego Gelman, el cual contiene el ADNc de los exones 1, 2, 3 y 4 del *Drd2* (pRiboD2E1E4); obtenidos por retrotranscripción a partir de ARN total, amplificados por PCR con *primers* específicos y clonados en el vector pGEMTeasy®; y con el objetivo de generar un molde apropiado para la obtención de una ribosonda específica del exón 2 del *Drd2*, se liberó un fragmento de 281 pb del exón 2 cortando con BamHI, dentro del exón, y EcoRI, en el vector. Este fragmento se volvió a clonar en pGEMTeasy® y al plásmido resultante se lo denominó pRiboD2E2.

#### *Síntesis de una ribosonda específica del exón 2 de Drd2*

Para sintetizar la ribosonda se incubó 1 µg del plásmido pRiboD2E2, previamente linealizado con la enzima de restricción BamHI, con el buffer de transcripción (Tris-HCl 40 mM, pH=8,0; MgCl<sub>2</sub> 15 mM; DTT 15 mM; BSA 0,05 mg/ml; 60 U de un inhibidor de ARNsas (ARNse out, Invitrogen); ATP, CTP y GTP 0,5 mM; 1000 µCi de [<sup>35</sup>S]-UTP (1250 Ci/mmol; Perkin Elmer) y 16 U de T7 polimerasa (New England Biolabs). Luego de incubar durante 70 minutos a 37 °C, se digiere el plásmido con Dnase I (Invitrogen). Las ribosondas se purifican con columnas (RNeasy® Mini Kit, Quiagen) y son eluidas en 50 ml de H<sub>2</sub>O ARNse free.

#### *Hibridación in situ con ribosondas*

Se obtienen secciones a partir de cerebros frescos congelados en isopentano a -30°C de ratones sin perfundir, inmediatamente incluidos en Tissue-Tek y congelados (1 h a -20°C).

Las secciones de 20  $\mu\text{m}$  de espesor congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  son descongeladas y equilibradas a temperatura ambiente (TA) al menos 30 min y luego tratadas con proteinasa K 10 mg/ml en buffer TE 10X (100 mM Tris, 10 mM EDTA) a TA por 15 min. Luego se lavan 2 veces con el mismo buffer y a continuación se tratan con trietanolamina (TEA) 0,1 M pH 8,0 por 3 min, se incuban en ácido acético anhidro 0,0025% en TEA 0,1 M por 10 min, se lavan dos veces en SSC 2 x (0,3 M NaCl, 0,03 M Citrato de Sodio, pH 7,2), y finalmente se deshidratan en forma rápida con etanol en concentraciones crecientes. Para la prehibridación se incuban los preparados con el buffer de hibridación (formamida 66 %, NaCl 260 mM, solución de Denhardt 1,3 x [50x: ficoll 1 %, polivinilpirrolidona 1 %, BSA 1 %], EDTA 1,3 mM, Tris-HCl 13 mM pH 8,0, sulfato de dextrano al 13 %) por 1 hora a  $57^{\circ}\text{C}$ . Las ribosondas marcadas con [ $^{35}\text{S}$ ] se calientan a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 5 min (con 0,5 mg/ml de ARNt y DTT 10 mM en agua) y se agregan al buffer de hibridación en una concentración de  $5 \times 10^6 - 10^7$  cpm/ml. La hibridación se realiza a  $57^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche. Al día siguiente los preparados son lavados 4 veces con SSC 4X y sujetos a digestión con ARNasa A (20 mg de ARNasa A/ml; 0,5 M NaCl; 10 mM Tris-HCl pH8; 1 mM EDTA pH 8,0) a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 min. Luego se someten a lavados sucesivos con SSC 2x, 1x, 0,5x /1mM DTT y a un lavado final a  $65^{\circ}\text{C}$  en SSC 0,1x /1mM DTT por 30 min. Después de un lavado rápido en la misma solución a TA, se deshidratan los preparados con concentraciones crecientes de etanol, se sumergen en emulsión Kodak N-TB2 (diluida 1:1 en agua destilada), y se dejan al resguardo de la luz por 15 - 20 días. Los preparados se revelan, se contratiñen con tionina, se deshidratan con etanol y se montan con Permount.

### **Hibridación *in situ* con ribosondas marcadas con dioxigenina**

Se utiliza un protocolo descrito en Schaeren-Wiemers y Gerfin-Moser (1993) y modificado en Hidalgo-Sánchez et al. (2005).

#### *Síntesis de una ribosonda específica del exón 2 de Drd2*

Utilizando el plásmido pRiboD2E2 y la DIG RNA Labelling Mix de Roche, se incuban 1  $\mu\text{g}$  del plásmido previamente linealizado con la enzima de restricción BamHI, con el buffer de transcripción 10x RNA MIX (10 mM ATP, CTP, GTP (each), 6.5 mM UTP, 3.5 mM DIG-11-UTP) y RNA polimerasa (Invitrogen) durante 2 h a  $37^{\circ}\text{C}$ . Se detiene la reacción con Dnase I (Invitrogen) por 15 min a  $37^{\circ}\text{C}$  y se agrega EDTA 25 mM RNase Free (Invitrogen). Las

ribosondas se purifican con columnas (RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit, Quiagen) y son eluidas en 30 ml de H<sub>2</sub>O RNase free.

*Hibridación in situ.* Se obtienen secciones de cerebros de ratones perfundidos con PFA 4 % RNase Free. Se fijan los cerebros 16 h y al día siguiente se lavan y se deshidratan con sacarosa 10 % en PBS RNase Free. El tejido se embebe en gelatina (Sigma) fundida a 37°C y luego se arman tacos que se dejan solidificar a temperatura ambiente o heladera. Los tacos de gelatina se orientan y se pegan sobre una base de corcho con una gota de Tissue-Tek. Se congelan en isopentano a -60°C y se almacenan a -80°C hasta cortar en crióstato para obtener secciones de 16 µm. El primer día de ensayo, las secciones son descongeladas y equilibradas a temperatura ambiente (TA) al menos 30 min. Se fijan en PFA 4 % durante 10 min; se lavan 3 veces en PBS RNase Free por 10 min; se realiza la acetilación con una solución con 234 ml de H<sub>2</sub>O, 3,2 ml de trietanolamina, 420 µl de HCl 36 % durante 10 min; se permeabilizan las secciones con Triton X-100 al 1 % en PBS por 30 min; 3 lavados de 10 min en PBS. Se procede a la prehibridación de 4 h en cámara húmeda con solución de prehibridación (1 ml de Salt solution (10x), 5 ml de Formamida, 2 ml de Dextran sulfato (50 % en H<sub>2</sub>O-d), 0,5 ml de tRNA (20 mg/ml), 0,2 ml de Solución de Denhart's (50mg/ml H<sub>2</sub>O-d), 1,3 ml de H<sub>2</sub>O) a TA. Luego, se reemplaza por solución de hibridación que contiene la ribosonda con digoxigenina que antes de ser agregada fue precalentada a 80°C durante 5 min y enfriada en hielo. En general, se calcula 1 µl de sonda cada 200 µl de solución de hibridación. Se agregan 200 µl de solución de hibridación a cada porta y se cubren con cubreobjetos antes de incubar toda la noche en cámara húmeda a 72°C en un horno de hibridación. Al día siguiente se retiran los portas y se lavan las secciones en SSC 0,2X a 72°C durante 1 – 2 horas. Luego, se lavan 5 min con SSC 0,2X a TA, 3 veces con solución B1 (0,1 M Tris pH 7,5; 0,15 M NaCl; Triton X-100 0,1 %. Se incuban en Solución B1 + anti-DiG Ab (1:3500 diluido en B1) + HINGS 1% (*heat inactivated goat serum*) a TA. Se colocan 500 µl por porta y se dejan toda la noche. Al día siguiente, se realizan 3 lavados con B1, dos lavados con Solución B2 (0,1M Tris pH 9,5; 0,1M NaCl; 50 mM 0,1 %), y se incuban en solución B3 (10 ml de B2 + 200 µl de NBT/BCIP (solución preparada MgCl<sub>2</sub>; Tween Roche 10554824, donde la concentración de NBT es de 18,75 mg/ml y de BCIP de 9,4 mg/ml) a TA entre 6 horas – 3 días en cámara húmeda. La reacción se detiene en B1 o PBS donde se realizan dos lavados. Se montan en Mowiol (Polyvinyl alcohol 40-88-Fluka).

## Ensayos de unión específica con radioligandos

Para este protocolo se utilizan cortes de crióstato de 16-20  $\mu\text{m}$  de espesor obtenidos de cerebros frescos congelados en isopentano y conservados a  $-20^{\circ}\text{C}$  protegidos de la humedad. Los vidrios se dejan equilibrar a temperatura ambiente durante 30 minutos, luego se preincuban durante 1 hora a temperatura ambiente en buffer de unión específica (Tris-HCl 50 mM, NaCl 120 mM, KCl 5 mM,  $\text{CaCl}_2$  2 mM,  $\text{MgCl}_2$  1mM,  $\text{pH}=7,4$ ). Seguidamente, se incuba en buffer de unión específica. Esta incubación dura 1 h a TA con los vidrios cubiertos con un trozo de *parafilm* para evitar la evaporación. Luego, las secciones se lavan 2 veces durante 5 minutos en  $\text{H}_2\text{O}$  destilada a  $4^{\circ}\text{C}$ , para finalmente secarlas con aire frío, desfavoreciendo así la disociación del ligando.

**Unión específica para detectar el receptor D2:** Buffer ESPECIFICO: 1 nM [ $^3\text{H}$ ]-nemonapride (antagonista específico de los receptores tipo D2), Buffer INESPECIFICO: 1 nM [ $^3\text{H}$ ]-nemonapride + 10 mM S(-)-sulpiride (antagonista específico de los receptores D2).

**Unión específica para detectar el receptor D1:** Buffer ESPECIFICO: 2 nM [ $^3\text{H}$ ]-SCH23390 (antagonista específico del receptor D1), Buffer INESPECIFICO: 2 nM [ $^3\text{H}$ ]-SCH23390 + 10 mM cis-(Z)-flupentixol (antagonista específico de los receptores D1 y D2).

**Autorradiografías** Los vidrios tratados son expuestos entre 15 y 30 días con films sensibles al tritio (Kodak Scientific Imaging Film, BIOMAX MR) a temperatura ambiente en un *cassette* oscuro o a una placa Amersham Hyperfilm durante 3-5 días.

## Inmunohistoquímica e Inmunofluorescencia en cortes flotantes

Las secciones utilizadas en este protocolo se obtienen por cortes en vibrátomo. En principio, las muestras sometidas a inmunohistoquímica (IHQ) en campo claro son incubadas a TA durante 1 hora en una solución 1 % de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en KPBS. El exceso se lava 2 veces durante 20 min en KPBS a temperatura ambiente (TA). El paso siguiente de la IHQ en campo claro o primer paso para la inmunofluorescencias (IF), es la incubación toda la noche en cámara húmeda a  $4^{\circ}\text{C}$  con agitación en una solución conteniendo anticuerpo primario y suero normal de cabra (NGS, SIGMA) 2 % en KPBS/0,3 % Tritón X-100. Al día siguiente, se lavan los cortes 2 veces durante 20 min en KPBS a temperatura ambiente para

luego incubar durante 2 horas a TA con agitación en una solución de anticuerpo secundario en 0,3 %-Tritón X-100 en KPBS. Luego, se lavan 2 veces durante 20 min en KPBS a TA.

En el caso de las IHQ en campo claro, se incuban los cortes durante 1 hora a TA con el complejo streptavidina/peroxidasa (ABC Kit, Vectastain, Vector Labs) preparado con 1 hora de anticipación. Siguen 2 lavados de 20 min a TA, el primero en KPBS y el segundo en TBS (50 mM Tris-HCl pH 7,2-7,6; 150 mM NaCl). Para el revelado, se incuban los cortes a TA con agitación hasta observar aparición de color marrón en una solución conteniendo 0,025 % de diaminobencidina (DAB, Sigma) y 0,05 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en TBS. La reacción de precipitación se detiene por dilución de los reactivos en TBS y luego se lava 2 veces durante 10 min en KPBS a temperatura ambiente antes de montar. Finalmente, se montan y deshidratan las secciones como se describirá más adelante.

En el caso de las IF, se procede a montar los cortes en vidrios Superfrost (Fisher) en KPBS. Se dejan secar levemente y se coloca un producto con compuestos protectores del bleaching (Vectashield) y se cubren con cubreobjetos (Fisher) que se aseguran con esmalte para evitar la deshidratación.

Anticuerpos utilizados para detectar: **EGFP:** anticuerpo primario policlonal hecho en conejo (1:10000, Abcam); **TH:** anticuerpo primario monoclonal hecho en mouse (1:10000, Chemicon); **TH:** anticuerpo primario policlonal hecho en conejo (1:1000, Milipore).

Anticuerpos secundarios: Para las **IHQ**, Anti IgG de conejo o de ratón, según corresponda, hecho en cabra (1:200, VectorLabs); para las **IF**, Anti IgG de conejo o ratón, según corresponda acoplado a FITC (1:500, Santa cruz)/ Alexa ETC.

### **Montado y deshidratación**

Las secciones flotantes sometidas a IHQ, deben ser montadas en portaobjetos antes de ser deshidratadas. Para ello se colocan las muestras en una solución conteniendo 1% de gelatina (Sigma) y 0.1 % de KCr(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. Las muestras son ubicadas sobre el portaobjetos con un pincel y luego secadas al aire durante 10-12 horas cubiertas del polvo. El protocolo de deshidratación consiste en colocar los vidrios durante 5-10 min secuencialmente en soluciones de etanol 70 % y 95 %, luego etanol 100 % y, finalmente, xileno. Luego se



Se cubren rápidamente los preparados con Permount (Fisher) y cubreobjetos (Fisher). Se deja secar al aire durante 10-12 horas su posterior observación y fotografiado.

### **Fotografías**

Utilizando una cámara de video (DC100, Leica), un microscopio de alto poder (DMLB, Leica) y un microscopio estereoscópico (M3C, Leica), acoplados a un software adecuado (IM50, Leica) de adquisición y procesamiento de imágenes, se obtienen las imágenes que serán mostradas como resultados en esta tesis de doctorado.

### **Determinación de L-DOPA**

Se trataron ratones con solución salina o con NSD-1015 (3-hydroxybenzylhydrazine) 100 mg/kg i.p., un inhibidor de la DOPA-decarboxilasa, y se sacrificaron luego de 40 min. El contenido de L-DOPA se determinó por HPLC acoplado a un detector electroquímico, como se describió previamente (Pellizari *et al.*, 2008) en el Hospital de Niños por la Dra. Gloria Levin. Cada estriado se cuantificó por separado y, luego, se promediaron antes de hacer el análisis estadístico. Cuando se administró quinpirol, se hizo 30 min antes del NSD-1015.

### Determinación de catecolaminas

Las muestras colectadas para realizar las determinaciones se acidifican a pH 1,0 con un volumen adecuado de ácido perclórico 0,3 N. 200 µl de medio fueron procesados para la determinación. Las catecolaminas fueron parcialmente purificadas mediante una batch de alúmina y separadas por una columna de cromatografía líquida de alta presión de fase reversa (*reverse-phase high-pressure liquid chromatography* - HPLC-ED) utilizando una columna de 4.6×250 mm Zorbax RX C18 (Agilent Technologies Inc, Santa Clara, CA, USA). La cuantificación se realizó después de este procedimiento y de exponer la columna a efluentes con potencial oxidante y reductor en serie utilizando un sistema de triple electrodo (Coulchem II, ESA, Bedford, MA, USA) (Eisenhofer *et al.*, 1986). El porcentaje de recuperación de catecolaminas en la fase de extracción con alúmina que se obtiene es del 70–80 %. Este protocolo permite determinar norepinefrina, epinefrina, dihidroxifenilalanina (DOPA), dopamina, ácido dihidroxifenilacético y dihidroxifenilglicol. La concentración de

catecolamina de cada muestra fue corregida teniendo en cuenta el porcentaje de recuperación mediante la recuperación obtenida para la dihidroxibenzilamina que se utiliza como estándar interno. Los coeficientes de variación inter e intraensayo fueron dl 10.6 % and 2.3 %, respectivamente. Los resultados fueron expresados como pmol/  $10^6$  cells/24 h en un pool a partir de medio de tres muestras diferentes (Pellizzari *et al*, 2008).

## **Experimentos conductuales**

### **Locomoción en cajas de actividad**

Se utiliza para determinar la actividad locomotora de un animal, así como su nivel de motivación por la actividad exploratoria y su capacidad de habituación. Esta prueba consiste en colocar a los ratones en un caja de acrílico de 40 x 40 x 40 cm (Med Associates), provista de un sistema de láseres de detección de movimiento conectado a una PC en la que el programa Activity Monitor (Med Associates) compila la información recibida a través de los siguientes parámetros: distancia total recorrida, velocidad promedio, episodios ambulatorios y áreas de preferencia, entre otros. En los experimentos farmacológicos, los ratones reciben inyecciones i.p. con solución salina o la droga correspondiente y se colocan en el campo abierto para medir su actividad locomotora.

### ***Rotarod***

La primera vez que se colocan los ratones sobre la barra, se dejan aclimatar durante 60 s antes de comenzar el experimento.

**Capítulo 1:** Se entrenaron ratones ( $n = 6-7$ ) por 3 días consecutivos en un *rotarod* (Med Associates, USA) a una velocidad fija de 16 rpm por 180 s. El tercer día, luego de 30 minutos de la última sesión de entrenamiento, se colocan los ratones en un programa acelerado sobre el *rotarod* 4 – 40 rpm por 5 min. Se registró la latencia a la primera caída.

**Capítulo 2:** En el caso de los programas de velocidad fija, los ratones se colocan sobre el *rotarod* a una velocidad de 16 rpm y se registra la cantidad y latencia de las caídas durante 180 s. Luego de cada caída, se vuelve a colocar el ratón sobre la barra que continuó girando; se detiene el tiempo mientras el ratón no esté sobre la barra. En los programas de velocidad acelerada de 4 – 40 rpm, el ratón se coloca sobre la barra que comienza a girar y en la primera caída, se registra la latencia y se termina el experimento. La cantidad de

ratones varía entre experimentos.

### **Test de luz/oscuridad**

Como se realizó previamente en Falzone et al. (2002), una cámara dividida en dos compartimentos por una pared con un agujero en el centro de 4 x 5 cm les permite a los ratones circular libremente. Cada compartimento es de 20 (ancho) x 26 (largo) x 14 (alto) cm con paredes opacas y material de piso normal. El ratón se coloca en un compartimento que inmediatamente se tapa con un techo de acrílico negro. El otro compartimento recibe la luz del ambiente. Se registra la latencia a la primera salida al compartimento luminoso, la cantidad de entradas y el tiempo que transcurren en cada compartimento durante un período de 5 min.

### **Test del objeto novedoso**

La prueba del objeto novedoso se llevó a cabo como describieron Bevins y Besheer (2006). Brevemente, habituamos los ratones durante 30 minutos durante 2 días consecutivos a cajas de 25 x 25 x 25 cm. En el tercer día, se les coloca en las mismas cajas durante 10 min en presencia de dos tubos de plástico idénticos. Una hora más tarde, vuelven a las jaulas y uno de los tubos se sustituye por una pelota de goma de tamaño similar. Se midió y trazó el número de veces que el ratón se acercó al nuevo objeto (la cabeza hacia la bola y la distancia de menos de 2 cm).

### **Condicionamiento de preferencia de lugar (CPP)**

Es un test que permite medir la preferencia por una droga que se asocia con un compartimento en particular (Cunningham *et al.*, 2006). El protocolo consiste en un primer día de *Pretest* donde se mide la preferencia por un tipo de piso en particular (con varillas separadas entre sí por 0,6 cm o con agujeros de 1,5 cm de diámetro). Luego, varias sesiones de condicionamiento (4 u 8) donde se alternan días de inyecciones i.p. de solución salina o cocaína. Y, finalmente, una sesión final de test donde se mide la preferencia por los tipos de pisos luego del condicionamiento.

Día 1 - *Pretest*. Se pesa al ratón y se lo inyecta con solución salina y se lo coloca en una cámara de acrílico de 15 x 15 x 30 cm con un piso de acero inoxidable dividido en dos mitades, una con agujeros de y la otra con varillas colocada dentro de las cajas de actividad

utilizadas anteriormente. Se registra la actividad locomotora durante 30 min y se calcula la cantidad de tiempo que cada ratón permanece en cada tipo de piso. A escala poblacional, los ratones no muestran preferencias por ninguno de estos pisos en particular pero sí pueden surgir diferencias individuales. Cuando un ratón muestra una leve preferencia por un tipo de piso particular, se asoció la droga al piso contrario. Se dividen los animales en dos grupos de condicionamiento.

Condicionamiento: Un grupo se condicionará con cocaína en el piso de agujeros y el otro grupo al piso de varillas. Dentro de cada grupo, la mitad de los animales recibe la primera sesión con salina y la otra mitad recibe cocaína el primer día de condicionamiento. La cantidad de sesiones de condicionamiento varían entre 4 y 8 según el experimento y la mitad de los días reciben solución salina y la otra mitad reciben cocaína cuya dosis varía según el experimento entre 0,5 y 5 mg/kg. Cada sesión de condicionamiento dura 5 min durante los cuales no se registra la actividad locomotora.

Día del *Test*: Luego de 24 horas de la última sesión de condicionamiento, cada ratón se inyecta con solución salina y se coloca en las cámaras sobre un piso mixto de varillas y agujeros, igual al del día del *Pretest*. Se registra la actividad durante 30 min y luego se analiza el tiempo que cada animal permanece en cada tipo de piso. Se comparan estos resultados con los del día del *Pretest*. Consideramos que un animal está condicionado si el tiempo que pasa en el piso asociado a la droga es mayor durante el *Test* que durante el *Pretest*, es decir, si aumentó luego del condicionamiento.

## **Tarea de tasa fija**

### **Adquisición y entrenamiento.**

Previamente al entrenamiento, los ratones adultos de 2 – 3 meses de edad fueron puestos en jaulas de a dos, donde se los acostumbró a las recompensas (bolitas de comida de 20 mg PJA1-0020 (*pellet*); Research Diets, inc., New Brunswick, NJ, USA) para evitar neofobia durante el entrenamiento (similar a Nemirovsky *et al.*, 2009). Luego de haber sido determinado su peso bajo condiciones de acceso *ad libitum* al alimento, éste último fue restringido para llevarlos al 85 % del peso establecido. Este procedimiento fue necesario en todas las experiencias descritas en este trabajo de tesis para impulsar a los animales a actuar sobre el ambiente (las cámaras operantes) con el fin de recibir recompensas

comestibles. Alcanzada esta condición, se comenzó con el entrenamiento.

Inicialmente se introdujo a los individuos en las cámaras operantes (Med Associates inc., St. Albans, VT, USA) donde, durante una hora recibirían un *pellet* al presionar una de las palancas y un *pellet* "gratis" por minuto de sesión. La palanca expuesta (derecha o izquierda) se determinó de manera pseudo-aleatoria y balanceada para obtener una distribución pareja a lo largo del orden de sesión, genotipo y tratamiento. Al día siguiente se sometieron a un procedimiento de tasa fija 1 (abreviado TF1) en el cual se entrega 1 *pellet* por cada respuesta a la palanca. La sesión duraba 1 hora o hasta que el ratón conseguía 99 *pellets*. Este esquema se mantuvo durante 1 semana y, luego, comenzaba el experimento.

### **Tasa fija**

Se colocaron los ratones en cámaras operantes una vez por día (1 sesión) para realizar procedimientos de tasa fija, donde la tasa se incrementaba cada 3 días desde TF3, TF10, TF30 hasta TF100. El experimento de TF100 sólo se realizó un solo día. Los ratones debían presionar la palanca un número fijo de veces para obtener una recompensa y la sesión se terminaba luego de 3 min de no detectar respuesta sobre la palanca (cut off 3 min). Los datos de la cantidad de *pellets* conseguidos por sesión se analizaron como un promedio sólo de los 2 últimos días para cada TF. Se analizaron los datos promedio para cada TF y cada ratón utilizando ANOVA de Medidas Repetidas.

### **Tarea de tasa progresiva**

#### **Adquisición y entrenamiento**

Dos semanas antes del entrenamiento, ratones adultos de 3 meses de edad fueron separados en jaulas de a dos, donde se los acostumbra a las recompensas (*pellets* de 20 mg PJA1-0020; Research Diets, inc., New Brunswick, NJ, USA) para evitar neofobia durante el entrenamiento. Durante esas semanas se registró su peso diariamente. Una semana antes del entrenamiento, se restringió el peso de los ratones al 85 % del peso establecido con acceso a la comida *ad libitum*. Alcanzada esta condición, se comenzó con el entrenamiento.

Inicialmente se introdujo a los individuos en las cámaras operantes (Med Associates inc., St.

Albans, VT, USA) donde, durante una hora recibirían un *pellet* al presionar una de las palancas y un *pellet* "gratis" por minuto de sesión. La palanca expuesta (derecha o izquierda) se determinó de manera pseudoaleatoria y balanceada para obtener una distribución pareja a lo largo del orden de sesión, genotipo y tratamiento. Al día siguiente, se pasó a un procedimiento de tasa fija 1 (abreviado FR1 por sus siglas en inglés *Fixed Ratio 1*) en el cual se entrega 1 *pellet* por cada respuesta a la palanca. Cuando consiguieran más de 50 *pellets* en el FR1 pasarían a un esquema de FR10 por otros 3 días. Los experimentos de FR duran 1 hora por día o hasta que el ratón consiga 99 *pellets*.

### **Tasa progresiva**

Luego se inició la etapa de tasa progresiva o TP durante dos semanas. Esta tarea consistió en aumentar progresivamente las presiones de palanca requeridas para obtener una recompensa y la tasa elegida fue de 2<sup>n</sup> para que sea realmente difícil para los ratones la escalada en la cantidad de presiones entre un *pellet* y el siguiente. Se realizó una sesión por día y se logró estimar el punto de quiebre o *breaking point* para cada ratón, es decir, la cantidad de *pellets* conseguidos cuando el experimento concluye después de 3 min que no se registra ninguna respuesta sobre la palanca (cut off de 3 min). La respuesta de cada ratón se vuelve estable a lo largo de los días y se obtiene el número de *pellets* conseguido promedio en las últimas 5 sesiones. Los resultados se analizaron con ANOVA de Medidas Repetidas para los últimos 5 días y no dieron diferencias, por ende, se analizó el número de presiones promedio, el número de *pellets* conseguidos y el tiempo de sesión para ambos genotipos utilizando ANOVA de 1 vía.

### **Extinción**

Los ratones se colocan en las cámaras operantes luego de terminar el TP pero ahora no se entrega más recompensa luego de una presión de palanca. Se someten los ratones durante 1 hora dos días consecutivos a este protocolo. Se registra la cantidad de presiones realizadas cada 10 min durante cada sesión. Se analiza con un ANOVA de Medidas Repetidas.

### **Preparación y administración de drogas**

Todas las drogas se inyectan según el peso de cada animal. Las soluciones a inyectar se

manera de administrar 100 µl de solución por cada 10 g de peso del ratón.

### **Haloperidol**

La preparación de haloperidol (Tocris, USA) consiste en pesar la cantidad correspondiente a la dosis y el volumen que se quiere utilizar, y agregar al tubo con la droga sólida la mitad del volumen final deseado de agua. Luego se incuba entre 1 y 2 horas a 50°C, vortexeando ocasionalmente y una vez disueltos todos los cristales, se agrega la otra mitad del volumen final deseado de solución salina 2x. Finalmente se agita suavemente observando que no haya precipitación de la droga. Para poner a punto las dosis a utilizar, se hicieron curvas con distintas dosis registrando la respuesta locomotora en ratones de cepa pura C57Bl6/J luego de 20 min de su administración vía intraperitoneal. El vehículo en todos los casos es NaCl 0,9 % (solución salina).

### **Cocaína**

La cocaína (Sigma) se disolvió en solución salina (NaCl 0,9 %) rápidamente. Para poner a punto las dosis a utilizar, se hicieron curvas con distintas dosis registrando la respuesta locomotora en ratones de cepa pura C57Bl6/J inmediatamente después de su inyección intraperitoneal. El vehículo en todos los casos es NaCl 0,9 % (solución salina).

### **Quinpirol**

El quinpirol (SIGMA, USA) se disuelve en solución salina, se administra por vía i.p. y se realizan los experimentos 30 min después de su inyección. Se hicieron curvas dosis-respuesta utilizando animales *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* y, en cada caso se eligió una dosis de preferencia. El vehículo en todos los casos es NaCl 0,9 % (solución salina).

### **Anfetamina**

La anfetamina (Sigma) se disolvió en solución salina (NaCl 0,9 %) rápidamente. La dosis elegida fue una dosis alta pero no extrema, según lo previamente reportado en la literatura.

### **Tamoxifeno**

El tamoxifeno (Sigma) se disuelve en aceite de sésamo (Sigma). Se prepara una solución 10

mg/ml y se vortexea y luego sónica durante 30 – 45 min hasta obtener la droga perfectamente disuelta. Se realizan alícuotas y se congelan a -20°C hasta su uso. En el momento de utilizarse, se descongela y se disuelve hasta 5 mg/ml con aceite de sésamo para inyectarse en forma intraperitoneal. Se realiza una inyección por día durante el tiempo indicado, según el caso. Se mantiene todo el tiempo protegido de la luz.

### **Gráficos y estadística**

Los gráficos se realizaron utilizando el programa *Graph Pad Prism 5* Versión para Windows 5.00. La estadística se realizó utilizando el programa *STATISTICA 7*. Analizamos los datos utilizando ANOVA y medidas repetidas cuando fue apropiado. Los ANOVAs significativos fueron seguidos de análisis *post hoc* de Fisher.



## APÉNDICE

En esta sección se muestran los resultados obtenidos por Yolanda Mateo y Jung Shin en el laboratorio del Dr. David Lovinger utilizando ratones *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* y autoDrd2KO, criados, mantenidos y genotipificados en nuestro Laboratorio.

### Métodos

#### Electrofisiología

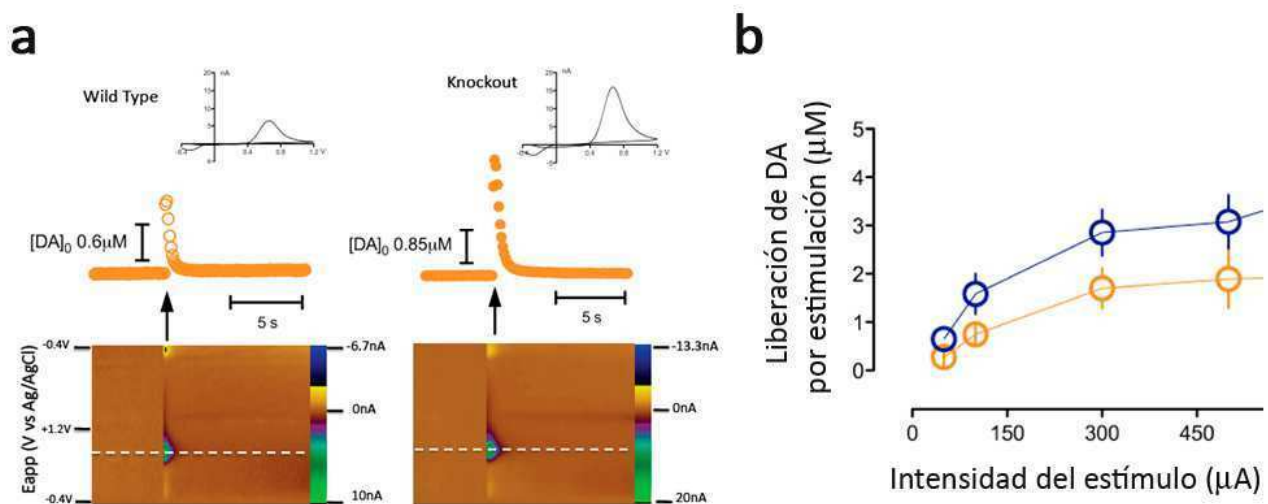
Se prepararon rodajas de coronales de cerebro de 220  $\mu\text{m}$  de ratones autoDrd2KO y los controles *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* (3-5 meses). Las rebanadas se recuperaron durante 20 min a 33°C y se colocaron en una cámara de perfusión a 2 ml min<sup>-1</sup> sumergida en líquido cefalorraquídeo artificial normal que contiene 124 mM de NaCl, 1 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,5 mM de KCl, 1,3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mM de CaCl<sub>2</sub>, 20 mM de glucosa, y 26,2 mM de NaHCO<sub>3</sub> a 31°C usando un calentador en línea (Harvard Apparatus). Se realizó la técnica de "control de potencial de parche" (*patch clamp*) en la configuración "célula entera" (*whole-cell*) utilizando electrodos de registro, con una resistencia  $\sim 2$  mW, que se llenaron con una solución que contiene 115 mM de potasio metilsulfato, 10 mM de BAPTA, 10 mM de sodio fosfocreatina, 10 mM de KCl, 1,5 MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 4 mM mM Na-ATP, y 0,4 Na-GTP (pH 7.2 a 7.3). Se utilizó la fosa interpeduncular y el núcleo medial del terminal de punto de referencia para localizar las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo, que se ve confirmado por actividades espontáneas a 2-5 Hz y la corriente I<sub>h</sub>. Las células fueron mantenidas a -55 mV y las corrientes de paso eran filtradas a 1 kHz y digitalizados a 5 kHz. Para la estimulación extracelular, pipetas estándar de parches llenos de fluido cerebroespinal artificial se colocaron  $\sim 100$   $\mu\text{m}$  caudal a la célula que se está grabando. Se aplicó un total de 10 pulsos de 1 ms de longitud a 100 Hz para evocar corrientes inhibitorias postsinápticas (IPSC) lentas en la presencia de NBQX (10 mM), el MK-801 (10 mM), gabazine (5 mM) y prazosina (100 nM).

#### Voltametría cíclica de barrido rápido (FSCV)

FSCV se realizó en rodajas coronales de cerebro de ratón que contenían el estriado dorsal (John *et al.*, 2006). Se prepararon microelectrodos cilíndricos de fibra de carbono (75-100  $\mu\text{m}$  de fibra expuesta) con fibras T650 (6- $\mu\text{m}$  de diámetro) insertados en una pipeta de vidrio. El electrodo de fibra de carbono se mantuvo en -0,4 V frente a Ag / AgCl y

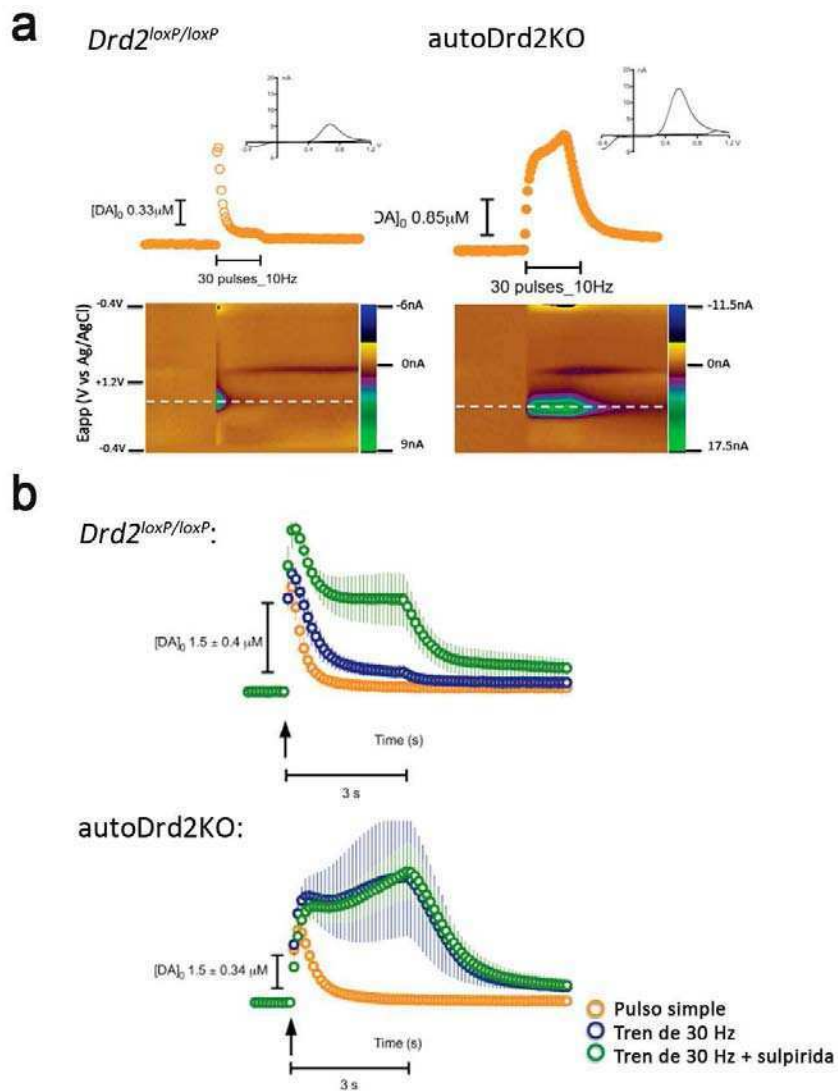
periódicamente un voltamograma cíclico fue adquirido (en intervalos de 100 ms). El potencial aplicado fue escaneado hasta +1,2 V ida y vuelta de manera triangular a 400 V s<sup>-1</sup>. La liberación de dopamina fue evocada por estimulaciones con un pulso único o con trenes de estimulación. Para estimulación de único pulso, se aplicó un pulso eléctrico rectangular (50 a 600  $\mu$ A, 0,6 ms por fase, bifásica) cada 5 minutos. Para los trenes de estimulación, se entregó un tren de 30 pulsos de 10 Hz (600  $\mu$ A, bifásica) a intervalos de 10 min. Diez voltamogramas cíclicos se registraron antes de la estimulación, se promediaron y se restaron de los voltamogramas cíclicos luego obtenidos. Una vez que la respuesta de dopamina extracelular a la estimulación eléctrica se mantuvo estable durante cinco estímulos sucesivos, se aplicaron las drogas a los cortes de cerebro. Llevamos a cabo cada prueba en una rebanada, que sirvió como su propio control previo al tratamiento y las tres condiciones se registraron en el mismo sitio para el mismo animal.

**Figura Suplementaria 1**



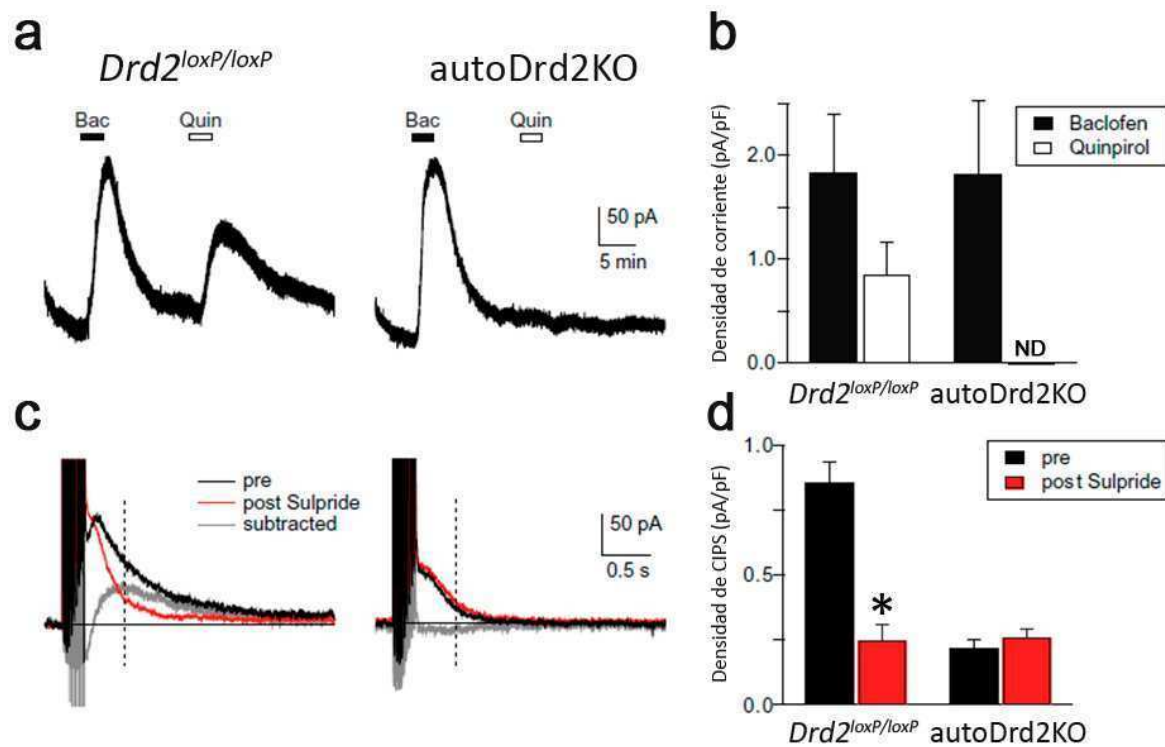
**Figura suplementaria 1. Liberación de dopamina frente a pulsos únicos.** (a) Liberación de dopamina en el estriado dorsal evocada por un pulso único de estimulación (300-600  $\mu$ A, 0,6 ms por fase, bifásico, flechas). Arriba, el perfil del curso de la concentración extracelular de dopamina registrada por el electrodo. Recuadros, representan los voltamogramas luego de restar los voltagramas control. Abajo, representación de los datos en 2 dimensiones. La corriente voltamétrica se representa versus el potencial aplicado (E<sub>app</sub>) y el tiempo de adquisición. (b) respuesta en la liberación de dopamina inducida frente a pulsos de estimulación de distintas intensidades en el estriado dorsal de ratones *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* (amarillo, n=4) y ratones autoDrd2KO (azules, n=5).  $F(1,29)=10,27, p<0,001$ .

**Figura Suplementaria 2**



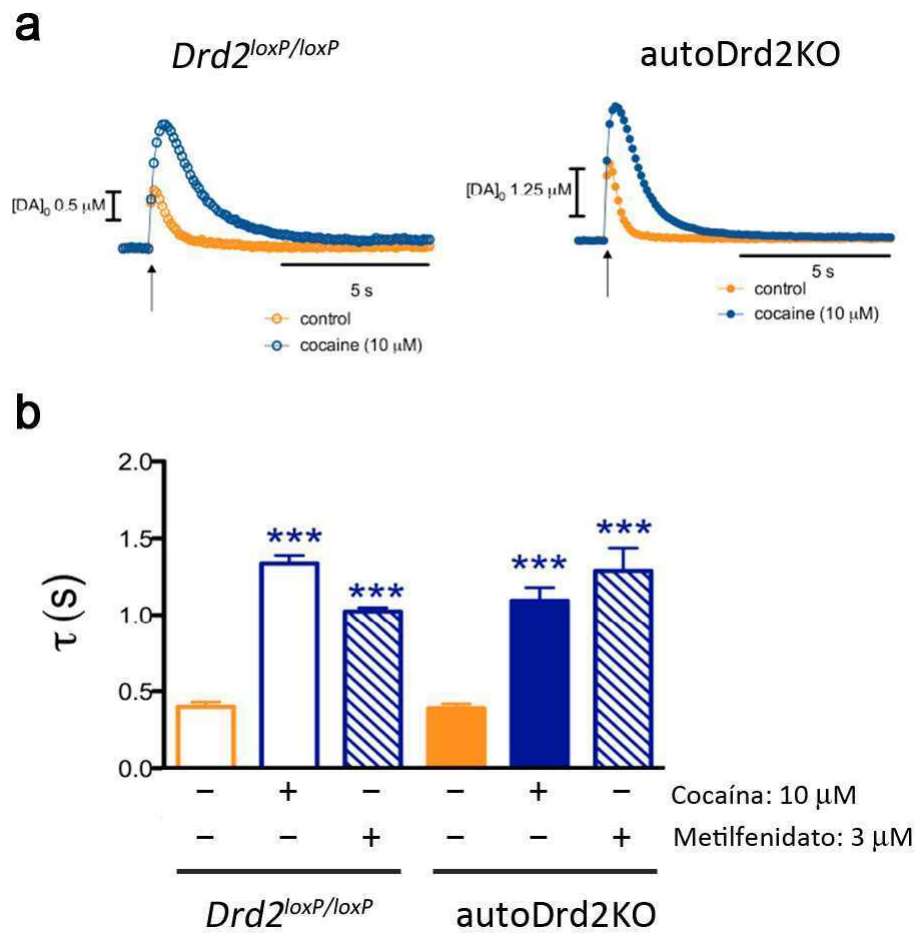
**Figura suplementaria 2. Liberación de dopamina frente a trenes de estimulación. (a)** Liberación de dopamina en el estriado dorsal evocada por trenes de 30 pulsos entregados a 10 Hz e intervalos de 10 min (duración del impulso de 0,6 ms, bifásica, la amplitud de 600 μA). Arriba, curso temporal de la concentración de dopamina con los mismos recuadros y gráficos que lo explicado en la Figura Suplementaria 1a. **(b)** Efecto de la sulpirida la liberación de dopamina evocada frente a un tren de estimulación. Cada cifra representa el promedio de concentración-tiempo para 8 ratones *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* y 9 ratones *autoDrd2KO*.

## Figura Suplementaria 3



**Figura suplementaria 3. La ablación selectiva de los autorreceptores D2 previene la inhibición somatodendrítica mediada por D2R en las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo.** (a) Registros de corriente de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo en experimentos de *patch clamp* de voltaje en configuración *whole cell* ( $V_h = -0,55$  mV). El Baclofen (BACL, 5  $\mu$ M) y el quinpirol (QUINP, 200 nm) se han aplicado según lo indicado por las barras negras horizontales. (b) La densidad de corriente inducida por cada agonista se trazan para las neuronas obtenidas a partir de ratones *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* y ratones *autoDrd2KO* ( $n = 6-7$ ). ND, no detectado. (c) Se representan en el gráfico los promedios de cinco trazas mostrando las IPSC inducidas mediante estimulación eléctrica antes (negro) y después de la aplicación sulpirida (rojo), así como el componente sensible al sulpirida (gris). Las líneas de puntos verticales indican el promedio de tiempo para alcanzar su punto máximo de la componente sulpirida sensible de la IPSC ( $0,43 \pm 0,10$  s,  $n = 7$ ) en las neuronas *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>*. (d) Se muestra la densidad de IPSC medidas en el tiempo medio para alcanzar su punto máximo antes y después de la sulpirida se muestran para ratones *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* y *autoDrd2KO* ( $n = 6-8$ ).  $*p < 0,005$ .

Figura Suplementaria 4



**Figura suplementaria 4. Recaptación de dopamina mediada por DAT.** (a) Representación de la liberación de dopamina evocada eléctricamente (un pulso, flechas) antes y después de la aplicación de cocaína. (b) Constante de decaimiento temporal ( $\tau$ ) de la señal de dopamina en ausencia y presencia de bloqueantes del DAT registrado en cortes de cerebro de ratones *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* (n=11) y *autoDrd2KO* (n= 14) (\* $p < 0.01$ ).

## BIBLIOGRAFÍA

- Aberman JE, Salamone JD. Nucleus accumbens dopamine depletions make rats more sensitive to high ratio requirements but do not impair primary food reinforcement. *Neuroscience*. 1999; 92(2):545-52.
- Abi-Dargham, A. et al. (2000) Increased baseline occupancy of D2 receptors by dopamine in schizophrenia. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S.* 97, 8104–8109
- Adams CD, Dickinson A. Instrumental responding following reinforcer devaluation. *Q. J. Exp. Psychol.* 33, 109–121 (1981).
- Adams DJ, van der Weyden L. Are we creating problems? Negative effects of Cre recombinase. *Genesis*. 2001 Mar; 29(3):115.
- Albin RL, Young AB, Penney JB. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* 1989 Oct; 12(10):366-75. Review.
- Alexander GE, Crutcher MD. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci.* 1990 Jul; 13(7):266-71. Review.
- Alexander GE, DeLong MR, Strick PL. Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurosci.* 1986; 9:357-81. Review.
- Alexander SPH, Mathie A, Peters JA (2009). *Guide to Receptors and Channels (GRAC)*, 4th edn. *Br J Pharmacol* 158 (Suppl. 1): S1–S254.
- Amara SG, Kuhar MJ. Neurotransmitter transporters: recent progress. *Annu Rev Neurosci.* 1993; 16:73-93. Review.
- Andersen PH, Gingrich JA, Bates MD, Dearry A, Falardeau P, Senogles SE, Caron MG. Dopamine receptor subtypes: beyond the D1/D2 classification. *Trends Pharmacol Sci.* 1990 Jun; 11(6):231-6. Review.
- Anthony JC, Warner LA, Kessler KC. Comparative epidemiology of dependence on tobacco, alcohol, controlled substances and the inhalants: Basic findings from the national comorbidity survey, *Exp Clin Psychopharmacol*, 1994, 2:244-68
- Araujo DM, Hilt DC, Miller PJ, Wen D, Jiao S, Lapchak PA. ret receptor tyrosine kinase immunoreactivity is altered in glial cell line-derived neurotrophic factor-responsive neurons following lesions of the nigrostriatal and septohippocampal pathways. *Neuroscience*. 1997 Sep; 80(1):9-16
- Argilli E, Sibley DR, Malenka RC, England PM, and Bonci A (2008) Mechanism and time course of cocaine-induced long-term potentiation in the ventral tegmental area. *J Neurosci* 28:9092–9100.
- Aubry J-M, Schulz M-F, Pagliusi S, Schultz P, Kiss JZ (1993) Coexpression of dopamine D2 and substance P (neurokinin-1) receptor messenger RNAs by a subpopulation of cholinergic neurons in the rat striatum. *Neuroscience* 53:417–424.
- Augood SJ, Westmore K, McKenna PJ, Emson PC. 1993. Co-expression of dopamine transporter mRNA and tyrosine hydroxylase mRNA in ventral mesencephalic neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 20:328–334.
- Avale ME, Falzone TL, Gelman DM, Low MJ, Grandy DK, Rubinstein M. The dopamine D4 receptor is essential for hyperactivity and impaired behavioral inhibition in a mouse model of attention deficit/hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry*. 2004 Jul; 9(7):718-26.
- Bäckman CM, Malik N, Zhang Y, Shan L, Grinberg A, Hoffer BJ, Westphal H, Tomac AC. Characterization of a mouse strain expressing Cre recombinase from the 3' untranslated region of the dopamine transporter locus. *Genesis*. 2006 Aug; 44(8):383-90.
- Baik JH, Picetti R, Saiardi A, Thiriet G, Dierich A, Depaulis A, Le Meur M, Borrelli E. Parkinsonian-like locomotor impairment in mice lacking dopamine D2 receptors. *Nature*. 1995 Oct 5; 377(6548):424-8.
- Baker DA, Shen H, and Kalivas PW (2002) Cystine/glutamate exchange serves as the source for extracellular glutamate: modifications by repeated cocaine administration. *Amino Acids* 23:161–162.
- Bamford NS, Zhang H, Schmitz Y, Wu NP, Cepeda C, Levine MS, Schmauss C, Zakharenko SS, Zablow L, Sulzer D. Heterosynaptic dopamine neurotransmission selects sets of corticostriatal terminals. *Neuron*. 2004 May 27; 42(4):653-63.
- Ban TA, Lehmann HE. Thiothixene and the thioxanthenes. *Adv Biochem Psychopharmacol.* 1974; 9(0):481-6.

- Barnes TD, Kubota Y, Hu D, Jin DZ, Graybiel AM. Activity of striatal neurons reflects dynamic encoding and recoding of procedural memories. *Nature*. 2005 Oct 20; 437(7062):1158-61.
- Beckstead MJ, Williams JT. Long-term depression of a dopamine IPSC. *J Neurosci*. 2007 Feb 21; 27(8):2074-80.
- Bello EP, Mateo Y, Gelman DM, Noaín D, Shin JH, Low MJ, Alvarez VA, Lovinger DM, Rubinstein M. Cocaine supersensitivity and enhanced motivation for reward in mice lacking dopamine D2 autoreceptors. *Nat Neurosci*. 2011 Jul 10; 14(8):1033-8.
- Bellone C and Luñscher C (2005) mGluRs induce a long-term depression in the ventral tegmental area that involves a switch of the subunit composition of AMPA receptors. *Eur J Neurosci* 21:1280–1288.
- Benecke R, Rothwell JC, Dick JP, Day BL, Marsden CD. Performance of simultaneous movements in patients with Parkinson's disease. *Brain*. 1986 Aug; 109 (Pt 4):739-57.
- Benoit-Marand M, Borrelli E, Gonon F. Inhibition of dopamine release via presynaptic D2 receptors: time course and functional characteristics in vivo. *J Neurosci*. 2001 Dec 1; 21(23):9134-41.
- Benoit-Marand M, Jaber M, Gonon F. Release and elimination of dopamine in vivo in mice lacking the dopamine transporter: functional consequences. *Eur J Neurosci*. 2000 Aug; 12(8):2985-92.
- Berke JD, Hyman SE. Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron*. 2000 Mar; 25(3):515-32. Review.
- Berridge KC, Kringelbach ML. Affective neuroscience of pleasure: reward in humans and animals. *Psychopharmacology (Berl)*. 2008 Aug; 199(3):457-80. Review.
- Berridge KC. The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive salience. *Psychopharmacology (Berl)*. 2007 Apr; 191(3):391-431. Review.
- Berridge KC, Robinson TE. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res Brain Res Rev*. 1998 Dec; 28(3):309-69. Review.
- Bevins RA, Besheer J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nat Protoc*. 2006; 1(3):1306-11.
- Beyer CE and Stokete JD (2002) Cocaine sensitization: modulation by dopamine D2 receptors. *Cereb Cortex* **12**:526–535.
- Binns KE, Salt TE. Excitatory amino acid receptors modulate habituation of the response to visual stimulation in the cat superior colliculus. *Vis Neurosci*. 1995 May-Jun; 12(3):563-71.
- Boileau I, Dagher A, Leyton M, Gunn RN, Baker GB, Diksic M, and Benkelfat C (2006) Modeling sensitization to stimulants in humans: an [<sup>11</sup>C]raclopride/positron emission tomography study in healthy men. *Arch Gen Psychiatry* 63: 1386–1395.
- Boileau I, Assaad JM, Pihl RO, Benkelfat C, Leyton M, Diksic M, Tremblay RE, Dagher A. Alcohol promotes dopamine release in the human nucleus accumbens. *Synapse*. 2003 Sep 15; 49(4):226-31.
- Borgland SL, Malenka RC, and Bonci A (2004) Acute and chronic cocaine-induced potentiation of synaptic strength in the ventral tegmental area: electrophysiological and behavioral correlates in individual rats. *J Neurosci* 24:7482–7490.
- Bossong MG, van Berckel BN, Boellaard R, Zuurman L, Schuit RC, Windhorst AD, van Gerven JM, Ramsey NF, Lammertsma AA, Kahn RS. Delta 9-tetrahydrocannabinol induces dopamine release in the human striatum. *Neuropsychopharmacology*. 2009 Feb; 34(3):759-66.
- Boulay D, Depoortere R, Perrault G, Borrelli E, Sanger DJ. Dopamine D2 receptor knock-out mice are insensitive to the hypolocomotor and hypothermic effects of dopamine D2/D3 receptor agonists. *Neuropharmacology*. 1999 Sep; 38(9):1389-96.
- Bouthenet ML, Souil E, Martres MP, Sokoloff P, Giros B, Schwartz JC. Localization of dopamine D3 receptor mRNA in the rat brain using in situ hybridization histochemistry: comparison with dopamine D2 receptor mRNA. *Brain Res*. 1991 Nov 15; 564(2):203-19.
- Bowers MS, McFarland K, Lake RW, Peterson YK, Lapish CC, Gregory ML, Lanier SM, and Kalivas PW (2004) Activator of G protein signaling 3: a gatekeeper of cocaine sensitization and drug seeking. *Neuron* **42**:269–281.

- Boyar WC, Altar CA. Modulation of in vivo dopamine release by D2 but not D1 receptor agonists and antagonists. *J Neurochem.* 1987 Mar; 48(3):824-31.
- Breier A, Su TP, Saunders R, Carson RE, Kolachana BS, de Bartolomeis A, Weinberger DR, Weisenfeld N, Malhotra AK, Eckelman WC, Pickar D. Schizophrenia is associated with elevated amphetamine-induced synaptic dopamine concentrations: evidence from a novel positron emission tomography method. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997 Mar 18; 94(6):2569-74.
- Britt JP, McGehee DS. Presynaptic opioid and nicotinic receptor modulation of dopamine overflow in the nucleus accumbens. *J Neurosci.* 2008 Feb 13; 28(7):1672-81.
- Brody AL, Mandelkern MA, Olmstead RE, Allen-Martinez Z, Scheibal D, Abrams AL, Costello MR, Farahi J, Saxena S, Monterosso J, London ED. Ventral striatal dopamine release in response to smoking a regular vs a denicotinized cigarette. *Neuropsychopharmacology.* 2009 Jan; 34(2):282-9.
- Bromberg-Martin ES, Matsumoto M, Hikosaka O. Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting. *Neuron.* 2010 Dec 9; 68(5):815-34. Review.
- Brown LL, Smith DM, Goldbloom LM. Organizing principles of cortical integration in the rat neostriatum: corticostriate map of the body surface is an ordered lattice of curved laminae and radial points. *J Comp Neurol.* 1998 Mar 23; 392(4):468-88.
- Brown LL, Sharp FR. Metabolic mapping of rat striatum: somatotopic organization of sensorimotor activity. *Brain Res.* 1995 Jul 24; 686(2):207-22.
- Buckholtz JW, Treadway MT, Cowan RL, Woodward ND, Benning SD, Li R, Ansari MS, Baldwin RM, Schwartzman AN, Shelby ES, Smith CE, Cole D, Kessler RM, Zald DH. Mesolimbic dopamine reward system hypersensitivity in individuals with psychopathic traits. *Nat Neurosci.* 2010 Apr; 13(4):419-21.
- Bunzow JR, Van Tol HH, Grandy DK, Albert P, Salon J, Christie M, Machida CA, Neve KA, Civelli O. Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA. *Nature.* 1988 Dec 22-29; 336(6201):783-7.
- Burris KD, Pacheco MA, Filtz TM, Kung MP, Kung HF, Molinoff PB. Lack of discrimination by agonists for D2 and D3 dopamine receptors. *Neuropsychopharmacology.* 1995 Jul; 12(4):335-45.
- Cadoni C, Pisanu A, Solinas M, Acquas E, and Di Chiara G (2001) Behavioural sensitization after repeated exposure to Delta 9-tetrahydrocannabinol and crosssensitization with morphine. *Psychopharmacology (Berl)* 158:259–266.
- Calabresi P, Pisani A, Mercuri NB, Bernardi G. The corticostriatal projection: from synaptic plasticity to dysfunctions of the basal ganglia. *Trends Neurosci.* 1996 Jan; 19(1):19-24. Review.
- Cardozo DL, Bean BP. Voltage-dependent calcium channels in rat midbrain dopamine neurons: modulation by dopamine and GABAB receptors. *J Neurophysiol.* 1995 Sep; 74(3):1137-48.
- Carelli RM. Nucleus accumbens cell firing and rapid dopamine signaling during goal-directed behaviors in rats. *Neuropharmacology.* 2004; 47 Suppl 1:180-9. Review.
- Carlsson A. The current status of the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology.* 1988 Sep; 1(3):179-86. Review.
- Carr GD, White NM. Conditioned place preference from intra-accumbens but not intra-caudate amphetamine injections. *Life Sci.* 1983 Dec 19; 33(25):2551-7.
- Cass WA, Gerhardt GA, Mayfield RD, Curella P, Zahniser NR. Differences in dopamine clearance and diffusion in rat striatum and nucleus accumbens following systemic cocaine administration. *J Neurochem.* 1992 Jul; 59(1):259-66
- Cass WA, Gerhardt GA (1994) Direct in vivo evidence that D2 dopamine receptors can modulate dopamine uptake. *Neurosci Lett* 176: 259–263
- Centonze D, Usiello A, Gubellini P, Pisani A, Borrelli E, Bernardi G, Calabresi P. Dopamine D2 receptor-mediated inhibition of dopaminergic neurons in mice lacking D2L receptors. *Neuropsychopharmacology.* 2002 Nov; 27(5):723-6.
- Cepeda C, Hurst RS, Altemus KL, Flores-Hernández J, Calvert CR, Jokel ES, Grandy DK, Low MJ, Rubinstein M, Ariano MA, Levine MS. Facilitated glutamatergic transmission in the striatum of D2 dopamine receptor-



- deficient mice. *J Neurophysiol*. 2001 Feb; 85(2):659-70.
- Chan CS, Guzman JN, Ilijic E, Mercer JN, Rick C, Tkatch T, Meredith GE, Surmeier DJ. 'Rejuvenation' protects neurons in mouse models of Parkinson's disease. *Nature*. 2007 Jun 28; 447(7148):1081-6.
- Charara A, Heilman TC, Levey AI, Smith Y. Pre- and postsynaptic localization of GABA(B) receptors in the basal ganglia in monkeys. *Neuroscience*. 2000; 95(1):127-40.
- Chausmer AL, Elmer GI, Rubinstein M, Low MJ, Grandy DK, Katz JL. Cocaine-induced locomotor activity and cocaine discrimination in dopamine D2 receptor mutant mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2002 Aug;163(1):54-61.
- Cheer JF, Aragona BJ, Heien ML, Seipel AT, Carelli RM, Wightman RM. Coordinated accumbal dopamine release and neural activity drive goal-directed behavior. *Neuron*. 2007 Apr 19; 54(2):237-44.
- Chen BT, Moran KA, Avshalumov MV, Rice ME. Limited regulation of somatodendritic dopamine release by voltage-sensitive Ca channels contrasted with strong regulation of axonal dopamine release. *J Neurochem*. 2006 Feb; 96(3):645-55.
- Chen BT, Bowers MS, Martin M, Hopf FW, Guillory AM, Carelli RM, Chou JK, and Bonci A (2008) Cocaine but not natural reward self-administration nor passive cocaine infusion produces persistent LTP in the VTA. *Neuron* 59:288-297.
- Chen JC, Chen PC, Chiang YC. Molecular mechanisms of psychostimulant addiction. *Chang Gung Med J*. 2009 Mar-Apr;32(2):148-54. Review.
- Chergui K, Svenningsson P, Nomikos GG, Gonon F, Fredholm BB, Svensson TH. Increased expression of NGFI-A mRNA in the rat striatum following burst stimulation of the medial forebrain bundle. *Eur J Neurosci*. 1997 Nov; 9(11):2370-82.
- Chergui K, Nomikos GG, Mathé JM, Gonon F, Svensson TH. Burst stimulation of the medial forebrain bundle selectively increase Fos-like immunoreactivity in the limbic forebrain of the rat. *Neuroscience*. 1996 May; 72(1):141-56.
- Chergui K, Suaud-Chagny MF, Gonon F. Nonlinear relationship between impulse flow, dopamine release and dopamine elimination in the rat brain in vivo. *Neuroscience*. 1994 Oct; 62(3):641-5.
- Chesi AJ, Feasey-Truger KJ, Alzheimer C, ten Bruggencate G. Dopamine autoreceptor sensitivity is unchanged in rat nucleus accumbens after chronic haloperidol treatment: an in vivo and in vitro voltammetric study. *Eur J Neurosci*. 1995 Dec 1; 7(12):2450-7.
- Chetrit J, Ballion B, Laquitaine S, Belujon P, Morin S, Taupignon A, Bioulac B, Gross CE, Benazzouz A. Involvement of Basal Ganglia network in motor disabilities induced by typical antipsychotics. *PLoS One*. 2009 Jul 9; 4(7):e6208.
- Clifford JJ, Kinsella A, Tighe O, Rubinstein M, Grandy DK, Low MJ, Croke DT, Waddington JL. Comparative, topographically-based evaluation of behavioural phenotype and specification of D(1)-like:D(2) interactions in a line of incipient congenic mice with D(2) dopamine receptor 'knockout'. *Neuropsychopharmacology*. 2001 Oct; 25(4):527-36.
- Clifford JJ, Usiello A, Vallone D, Kinsella A, Borrelli E, Waddington JL. Topographical evaluation of behavioural phenotype in a line of mice with targeted gene deletion of the D2 dopamine receptor. *Neuropharmacology*. 2000 Jan 28; 39(3):382-90.
- Civelli O, Bunzow JR, Grandy DK. Molecular diversity of the dopamine receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1993; 33:281-307. Review.
- Costa RM, Cohen D, Nicoletis MA. Differential corticostriatal plasticity during fast and slow motor skill learning in mice. *Curr Biol*. 2004 Jul 13; 14(13):1124-34.
- Cotzias GC, Van Woert MH, Schiffer LM. Aromatic amino acids and modification of parkinsonism. *N Engl J Med*. 1967 Feb 16; 276(7):374-9.
- Cox SM, Benkelfat C, Dagher A, Delaney JS, Durand F, McKenzie SA, Kolivakis T, Casey KF, and Leyton M (2009) Striatal dopamine responses to intranasal cocaine self-administration in humans. *Biol Psychiatry* 65:846-850.

- Cragg SJ, Greenfield SA. Differential autoreceptor control of somatodendritic and axon terminal dopamine release in substantia nigra, ventral tegmental area, and striatum. *J Neurosci*. 1997 Aug 1; 17(15):5738-46.
- Cragg SJ. Variable dopamine release probability and short-term plasticity between functional domains of the primate striatum. *J Neurosci*. 2003 May 15; 23(10):4378-85.
- Crombag HS, Badiani A, Maren S, Robinson TE. The role of contextual versus discrete drug-associated cues in promoting the induction of psychomotor sensitization to intravenous amphetamine. *Behav Brain Res*. 2000 Nov 15; 116(1):1-22.
- Cubeddu LX, Hoffmann IS. Operational characteristics of the inhibitory feedback mechanism for regulation of dopamine release via presynaptic receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 1982 Nov; 223(2):497-501. No abstract available
- Cunningham CL, Gremel CM, Groblewski PA. Drug-induced conditioned place preference and aversion in mice. *Nat Protoc*. 2006; 1(4):1662-70.
- Cunningham CL, Howard MA, Gill SJ, Rubinstein M, Low MJ, Grandy DK. Ethanol-conditioned place preference is reduced in dopamine D2 receptor-deficient mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2000 Dec; 67(4):693-9.
- Cunningham CL and Noble D (1992) Conditioned activation induced by ethanol: role in sensitization and conditioned place preference. *Pharmacol Biochem Behav* 43:307-313.
- Curran C, Byrappa N, McBride A. Stimulant psychosis: systematic review. *Br J Psychiatry*. 2004 Sep;185:196-204. Review.
- Dagher, A., and Robbins, T.W. (2009). Personality, addiction, dopamine: insights from Parkinson's disease. *Neuron* 61, 502-510.
- Dahlström A, Fuxe K. Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*. 1964 Jul 15; 20(7):398-9.
- Dalley JW, Theobald DE, Berry D, Milstein JA, Lääne K, Everitt BJ, Robbins TW. Cognitive sequelae of intravenous amphetamine self-administration in rats: evidence for selective effects on attentional performance. *Neuropsychopharmacology*. 2005 Mar; 30(3):525-37.
- Dal Toso R, Sommer B, Ewert M, Herb A, Pritchett DB, Bach A, Shivers BD, Seeburg PH. The dopamine D2 receptor: two molecular forms generated by alternative splicing. *EMBO J*. 1989 Dec 20; 8(13):4025-34.
- Davila V, Yan Z, Craciun LC, Logothetis D, Sulzer D. D3 dopamine autoreceptors do not activate G-protein-gated inwardly rectifying potassium channel currents in substantia nigra dopamine neurons. *J Neurosci*. 2003 Jul 2; 23(13):5693-7.
- DeBoer P, Heeringa MJ, Abercrombie ED. Spontaneous release of acetylcholine in striatum is preferentially regulated by inhibitory dopamine D2 receptors. *Eur J Pharmacol*. 1996 Dec 19;317(2-3):257-62.
- DeLong MR. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci*. 1990 Jul;13(7):281-5. Review.
- Deroche-Gamonet V, Belin D, Piazza PV. Evidence for addiction-like behavior in the rat. *Science*. 2004 Aug 13; 305(5686):1014-7.
- Di Chiara G, Bassareo V, Fenu S, De Luca MA, Spina L, Cadoni C, Acquas E, Carboni E, Valentini V, Lecca D. Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection. *Neuropharmacology*. 2004; 47 Suppl 1:227-41. Review.
- Di Chiara G, Morelli M, Conso S (1994) Modulatory functions of neurotransmitters in the striatum: ACh/dopamine/NMDA interactions. *Trends Neurosci* 17:228-233.
- Di Chiara G, Imperato A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Jul; 85(14):5274-8.
- Di Chiara G, Morelli M, Acquas E, Carboni E. Functions of dopamine in the extrapyramidal and limbic systems. Clues for the mechanism of drug actions. *Arzneimittelforschung*. 1992 Feb; 42(2A):231-7. Review.
- Di Chiara G, Porceddu ML, Vargiu L, Argiolas A, Gessa GL. Evidence for dopamine receptors mediating sedation in the mouse brain. *Nature*. 1976 Dec 9; 264(5586):564-7.

- Di Ciano P, Blaha CD, Phillips AG. Changes in dopamine efflux associated with extinction, CS-induced and d-amphetamine-induced reinstatement of drug-seeking behavior by rats. *Behav Brain Res.* 2001 May; 120(2):147-58.
- Diaz J, Lévesque D, Lammers CH, Griffon N, Martres MP, Schwartz JC, Sokoloff P. Phenotypical characterization of neurons expressing the dopamine D3 receptor in the rat brain. *Neuroscience.* 1995 Apr; 65(3):731-45.
- Dickinson SD, Sabeti J, Larson GA, Giardina K, Rubinstein M, Kelly MA, Grandy DK, Low MJ, Gerhardt GA, Zahniser NR. Dopamine D2 receptor-deficient mice exhibit decreased dopamine transporter function but no changes in dopamine release in dorsal striatum. *J Neurochem.* 1999 Jan; 72(1):148-56.
- Doty HU, Misgeld U. Muscarinic slow excitation and muscarinic inhibition of synaptic transmission in the rat neostriatum. *J Physiol.* 1986 Nov; 380:593-608.
- Drevets WC, Gautier C, Price JC, Kupfer DJ, Kinahan PE, Grace AA, Price JL, Mathis CA. Amphetamine-induced dopamine release in human ventral striatum correlates with euphoria. *Biol Psychiatry.* 2001 Jan 15; 49(2):81-96.
- Dwoskin LP, Zahniser NR. Robust modulation of [3H]dopamine release from rat striatal slices by D-2 dopamine receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 1986 Nov; 239(2):442-53.
- Eilam D, Szechtman H. Biphasic effect of D-2 agonist quinpirole on locomotion and movements. *Eur J Pharmacol.* 1989 Feb 28; 161(2-3):151-7.
- Everitt BJ, Belin D, Economidou D, Pelloux Y, Dalley JW, Robbins TW. Review. Neural mechanisms underlying the vulnerability to develop compulsive drug-seeking habits and addiction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2008 Oct 12; 363(1507):3125-35. Review.
- Everitt BJ, Robbins TW. Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci.* 2005 Nov; 8(11):1481-9. Review. Erratum in: *Nat Neurosci.* 2006 Jul; 9(7):979.
- Falzone TL, Gelman DM, Young JI, Grandy DK, Low MJ, Rubinstein M. Absence of dopamine D4 receptors results in enhanced reactivity to unconditioned, but not conditioned, fear. *Eur J Neurosci.* 2002 Jan; 15(1):158-64.
- Faure A, Haberland U, Condé F, El Massioui N. Lesion to the nigrostriatal dopamine system disrupts stimulus-response habit formation. *J Neurosci.* 2005 Mar 16; 25(11):2771-80.
- File SE. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. *Behav Brain Res.* 2001 Nov 1; 125(1-2):151-7. Review.
- Flaherty AW, Graybiel AM. Corticostriatal transformations in the primate somatosensory system. Projections from physiologically mapped body-part representations. *J Neurophysiol.* 1991 Oct; 66(4):1249-63.
- Flajolet M, Wang Z, Fetter M, Shen W, Nuangchamnong N, Bendor J, Wallach I, Nairn AC, Surmeier DJ, Greengard P. FGF acts as a co-transmitter through adenosine A(2A) receptor to regulate synaptic plasticity. *Nat Neurosci.* 2008 Dec; 11(12):1402-9.
- Fowler JS, Volkow ND, Logan J, Alexoff D, Telang F, Wang GJ, Wong C, Ma Y, Kriplani A, Pradhan K, Schlyer D, Jayne M, Hubbard B, Carter P, Warner D, King P, Shea C, Xu Y, Muench L, Apelskog K. Fast uptake and long-lasting binding of methamphetamine in the human brain: comparison with cocaine. *Neuroimage.* 2008 Dec; 43(4):756-63.
- Frankle, W.G. et al. (2004) Occupancy of dopamine D2 receptors by the atypical antipsychotic drugs risperidone and olanzapine: theoretical implications. *Psychopharmacology (Berl.)* 175, 473-480
- Fuxe K, Agnati LF, Kalia M, Goldstein M, Andersson K, HLFstrand A. (1985) Dopaminergic systems in the brain and pituitary. In: *The dopaminergic system* (Flickiger E, Müller EE, Thorner MO, eds), pp 1-25. New-York: Springer Sandoz.
- Gainetdinov RR, Jones SR, Caron MG. Functional hyperdopaminergia in dopamine transporter knock-out mice. *Biol Psychiatry.* 1999 Aug 1; 46(3):303-11. Review.
- Gan JO, Walton ME, Phillips PE. Dissociable cost and benefit encoding of future rewards by mesolimbic dopamine. *Nat Neurosci.* 2010 Jan; 13(1):25-7.

- Garris PA, Wightman RM. Different kinetics govern dopaminergic transmission in the amygdala, prefrontal cortex, and striatum: an in vivo voltammetric study. *J Neurosci*. 1994 Jan; 14(1):442-50.
- Gerfen CR, Surmeier DJ. Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annu Rev Neurosci*. 2011; 34:441-66. Review.
- Gerfen C. R. The Basal Ganglia. *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. Amsterdam. 12 Integrated Systems of the CNS 1996; 371-468.
- Gerfen CR, Keefe KA, Gauda EB. D1 and D2 dopamine receptor function in the striatum: coactivation of D1- and D2-dopamine receptors on separate populations of neurons results in potentiated immediate early gene response in D1-containing neurons. *J Neurosci*. 1995 Dec;15(12):8167-76.
- Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susei Z, Chase TN, Monsma Jr FJ, Sibley DR (1990) D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250:1429–1432.
- Ghasemzadeh MB, Permenter LK, Lake R, Worley PF, and Kalivas PW (2003) Homer1 proteins and AMPA receptors modulate cocaine-induced behavioural plasticity. *Eur J Neurosci* **18**:1645–1651.
- Gingrich JA, Caron MG. Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Annu Rev Neurosci*. 1993; 16:299-321. Review.
- Giorgetti M, Hotsenpiller G, Ward P, Teppen T, and Wolf ME (2001) Amphetamine-induced plasticity of AMPA receptors in the ventral tegmental area: effects on extracellular levels of dopamine and glutamate in freely moving rats. *J Neurosci* **21**:6362–6369.
- Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM, Caron MG. Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature*. 1996 Feb 15; 379(6566):606-12.
- Giros B, Martres MP, Sokoloff P, Schwartz JC. [Gene cloning of human dopaminergic D3 receptor and identification of its chromosome]. *C R Acad Sci III*. 1990; 311(13):501-8. French.
- Goldstein RZ, Volkow ND. Drug addiction and its underlying neurobiological basis: neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. *Am J Psychiatry*. 2002 Oct; 159(10):1642-52. Review.
- Golembiowska K, Zylewska A. Agonists of A1 and A2A adenosine receptors attenuate methamphetamine-induced overflow of dopamine in rat striatum. *Brain Res*. 1998 Sep 28; 806(2):202-9.
- Gonon F. Prolonged and extrasynaptic excitatory action of dopamine mediated by D1 receptors in the rat striatum in vivo. *J Neurosci*. 1997 Aug 1; 17(15):5972-8.
- Gonon FG, Buda MJ. Regulation of dopamine release by impulse flow and by autoreceptors as studied by in vivo voltammetry in the rat striatum. *Neuroscience*. 1985 Mar; 14(3):765-74.
- Gonon FG. Nonlinear relationship between impulse flow and dopamine released by rat midbrain dopaminergic neurons as studied by in vivo electrochemistry. *Neuroscience*. 1988 Jan; 24(1):19-28.
- González S, Rangel-Barajas C, Peper M, Lorenzo R, Moreno E, Ciruela F, Borycz J, Ortiz J, Lluís C, Franco R, McCormick PJ, Volkow ND, Rubinstein M, Floran B, Ferré S. Dopamine D(4) receptor, but not the ADHD-associated D(4. 7) variant, forms functional heteromers with the dopamine D(2S) receptor in the brain. *Mol Psychiatry*. 2011 Aug 16.
- Grace AA, Bunney BS. The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing. *J Neurosci*. 1984 Nov; 4(11):2877-90.
- Grace AA, Bunney BS, Moore H, Todd CL. Dopamine-cell depolarization block as a model for the therapeutic actions of antipsychotic drugs. *Trends Neurosci*. 1997 Jan; 20(1):31-7. Review.
- Grandy DK, Marchionni MA, Makam H, Stofko RE, Alfano M, Frothingham L, Fischer JB, Burke-Howie KJ, Bunzow JR, Server AC, et al. Cloning of the cDNA and gene for a human D2 dopamine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Dec; 86(24):9762-6.
- Graybiel AM. Habits, rituals, and the evaluative brain. *Annu Rev Neurosci*. 2008;31:359-87. Review.
- Graybiel AM. The basal ganglia: learning new tricks and loving it. *Curr Opin Neurobiol*. 2005 Dec; 15(6):638-44. Review.
- Graybiel AM. The basal ganglia. *Curr Biol*. 2000 Jul 13; 10(14):R509-11. Review.

- Graybiel AM. The basal ganglia and the initiation of movement. *Rev Neurol (Paris)*. 1990; 146(10):570-4. Review.
- Greengard P. Possible role for cyclic nucleotides and phosphorylated membrane proteins in postsynaptic actions of neurotransmitters. *Nature*. 1976 Mar 11; 260(5547):101-8. Review.
- Gustafson N, Gireesh-Dharmaraj E, Czubayko U, Blackwell KT, Plenz D. A comparative voltage and current-clamp analysis of feedback and feedforward synaptic transmission in the striatal microcircuit in vitro. *J Neurophysiol*. 2006 Feb;95(2):737-52.
- Hallett M. The intrinsic and extrinsic aspects of freezing of gait. *Mov Disord*. 2008; 23 Suppl 2:S439-43. Review. Erratum in: *Mov Disord*. 2008 Aug 15; 23(11):1639-40.
- Haubrich DR, Pflueger AB. The autoreceptor control of dopamine synthesis. An in vitro and in vivo comparison of dopamine agonists. *Mol Pharmacol*. 1982 Jan; 21(1):114-20. No abstract available.
- Hayashi, Shigemi; McMahon, Andrew Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Developmental Biology* 2002 244, 305–318.
- Heidbreder CA, Thompson AC, Shippenberg TS. Role of extracellular dopamine in the initiation and long-term expression of behavioral sensitization to cocaine. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996 Aug; 278(2):490-502.
- Henry DJ, Greene MA, and White FJ (1989) Electrophysiological effects of cocaine in the mesoaccumbens dopamine system: repeated administration. *J Pharmacol Exp Ther* 251:833–839.
- Hersch SM, Ciliax BJ, Gutekunst C-A, Rees HD, Heilman CJ, Yung KKL, 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.
- Hidalgo-Sánchez M, Martínez-de-la-Torre M, Alvarado-Mallart RM, Puelles L. A distinct preisthmus histogenetic domain is defined by overlap of *Otx2* and *Pax2* gene expression in the avian caudal midbrain. *J Comp Neurol*. 2005 Feb 28; 483(1):17-29.
- Hooks MS, Duffy P, Striplin C, Kalivas PW. Behavioral and neurochemical sensitization following cocaine self-administration. *Psychopharmacology (Berl)*. 1994 Jun; 115(1-2):265-72.
- Hornykiewicz O. The metabolism of brain dopamine in human parkinsonism. *Riv Patol Nerv Ment*. 1970 Oct; 91(5):281-6.
- Hornykiewicz O. Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function. *Pharmacol Rev*. 1966 Jun; 18(2):925-64. Review.
- Hoshiyama M, Kaneoke Y, Koike Y, Takahashi A, Watanabe S. Hypokinesia of associated movement in Parkinson's disease: a symptom in early stages of the disease. *J Neurol*. 1994 Aug; 241(9):517-21.
- Houk JC, Wise SP. Distributed modular architectures linking basal ganglia, cerebellum, and cerebral cortex: their role in planning and controlling action. *Cereb Cortex*. 1995 Mar-Apr; 5(2):95-110. Review.
- Hsu KS, Huang CC, Yang CH, Gean PW. Presynaptic D2 dopaminergic receptors mediate inhibition of excitatory synaptic transmission in rat neostriatum. *Brain Res*. 1995 Sep 4; 690(2):264-8.
- Iannazzo L, Sathananthan S, Majewski H (1997) Modulation of dopamine release from rat striatum by protein kinase C: interaction with presynaptic D2-dopamine-autoreceptors. *Br J Pharmacol* 122: 1561–1566
- Ishiwari K, Weber SM, Mingote S, Correa M, Salamone JD. Accumbens dopamine and the regulation of effort in food-seeking behavior: modulation of work output by different ratio or force requirements. *Behav Brain Res*. 2004 May 5; 151(1-2):83-91.
- Jedynak JP, Uslaner JM, Esteban JA, Robinson TE. Methamphetamine-induced structural plasticity in the dorsal striatum. *Eur J Neurosci*. 2007 Feb; 25(3):847-53.
- Jin X, Costa RM. Start/stop signals emerge in nigrostriatal circuits during sequence learning. *Nature*. 2010 Jul 22; 466(7305):457-62.
- Joel D, Weiner I. The organization of the basal ganglia-thalamocortical circuits: open interconnected rather than closed segregated. *Neuroscience*. 1994 Nov; 63(2):363-79. Review.

- John CE, Budygin EA, Mateo Y, Jones SR. Neurochemical characterization of the release and uptake of dopamine in ventral tegmental area and serotonin in substantia nigra of the mouse. *J Neurochem*. 2006 Jan; 96(1):267-82.
- Jones SR, Gainetdinov RR, Hu XT, Cooper DC, Wightman RM, White FJ, Caron MG (1999) Loss of autoreceptor functions in mice lacking the dopamine transporter. *Nat Neurosci* 2: 649–655
- Jones SR, Gainetdinov RR, Jaber M, Giros B, Wightman RM, Caron MG. Profound neuronal plasticity in response to inactivation of the dopamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998b Mar 31; 95(7):4029-34.
- Jones SR, Gainetdinov RR, Wightman RM, Caron MG. Mechanisms of amphetamine action revealed in mice lacking the dopamine transporter. *J Neurosci*. 1998a Mar 15; 18(6):1979-86. Review.
- Joseph JD, Wang YM, Miles PR, Budygin EA, Picetti R, Gainetdinov RR, Caron MG, Wightman RM. Dopamine autoreceptor regulation of release and uptake in mouse brain slices in the absence of D(3) receptors. *Neuroscience*. 2002; 112(1):39-49.
- Joyce EM and Iversen SD (1979) The effect of morphine applied locally to mesencephalic dopamine cell bodies on spontaneous motor activity in the rat. *Neurosci Lett* 14:207–212.
- Jueptner M, Frith CD, Brooks DJ, Frackowiak RS, Passingham RE. Anatomy of motor learning. II. Subcortical structures and learning by trial and error. *J Neurophysiol*. 1997 Mar; 77(3):1325-37.
- Jung MY, Skryabin BV, Arai M, Abbondanzo S, Fu D, Brosius J, Robakis NK, Polites HG, Pintar JE, Schmauss C. Potentiation of the D2 mutant motor phenotype in mice lacking dopamine D2 and D3 receptors. *Neuroscience*. 1999; 91(3):911-24.
- Kalivas PW, Duffy P. Time course of extracellular dopamine and behavioral sensitization to cocaine. I. Dopamine axon terminals. *J Neurosci*. 1993 Jan; 13(1):266-75.
- Kalivas PW and Duffy P (1995) D1 receptors modulate glutamate transmission in the ventral tegmental area. *J Neurosci* 15:5379–5388.
- Kalivas PW and Stewart J (1991) Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. *Brain Res Rev* 16:223–244.
- Kaneko S, Hikida T, Watanabe D, Ichinose H, Nagatsu T, Kreitman RJ, Pastan I, Nakanishi S (2000) Synaptic integration mediated by striatal cholinergic interneurons in basal ganglia function. *Science* 289:633–637.
- Kapatos G, Zigmond MJ. Effect of haloperidol on dopamine synthesis and tyrosine hydroxylase in striatal synaptosomes. *J Pharmacol Exp Ther*. 1979 Mar; 208(3):468-75. No abstract available.
- Kapur S, VanderSpek SC, Brownlee BA, Nobrega JN (2003) Antipsychotic dosing in preclinical models is often unrepresentative of the clinical condition: a suggested solution based on in vivo occupancy. *J Pharmacol Exp Ther* 305: 625–631
- Kargo WJ, Nitz DA. Improvements in the signal-to-noise ratio of motor cortex cells distinguish early versus late phases of motor skill learning. *J Neurosci*. 2004 Jun 16; 24(24):5560-9.
- Karni A, Meyer G, Rey-Hipolito C, Jezard P, Adams MM, Turner R, Ungerleider LG. The acquisition of skilled motor performance: fast and slow experience-driven changes in primary motor cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Feb 3; 95(3):861-8. Review.
- Karreman M, Westerink BH, and Moghaddam B (1996) Excitatory amino acid receptors in the ventral tegmental area regulate dopamine release in the ventral striatum. *J Neurochem* 67:601–607.
- Kauer JA, Malenka RC. Synaptic plasticity and addiction. *Nat Rev Neurosci*. 2007 Nov; 8(11):844-58. Review.
- Kawagoe KT, Garris PA, Wiedemann DJ, Wightman RM. Regulation of transient dopamine concentration gradients in the microenvironment surrounding nerve terminals in the rat striatum. *Neuroscience*. 1992 Nov; 51(1):55-64.
- Kawaguchi Y. Neostriatal cell subtypes and their functional roles. *Neurosci Res*. 1997 Jan; 27(1):1-8. Review.
- Kebabian JW, Calne DB. Multiple receptors for dopamine. *Nature*. 1979 Jan 11; 277(5692):93-6. Review.

- Keefe KA, Gerfen CR. D1-D2 dopamine receptor synergy in striatum: effects of intrastriatal infusions of dopamine agonists and antagonists on immediate early gene expression. *Neuroscience*. 1995 Jun;66(4):903-13.
- Kehr W, Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T, Atack C. Evidence for a receptor-mediated feedback control of striatal tyrosine hydroxylase activity. *J Pharm Pharmacol*. 1972 Sep; 24(9):744-7. No abstract available.
- Kelly MA, Low MJ, Rubinstein M, Phillips TJ. Role of dopamine D1-like receptors in methamphetamine locomotor responses of D2 receptor knockout mice. *Genes Brain Behav*. 2008 Jul; 7(5):568-77.
- Kelly MA, Rubinstein M, Phillips TJ, Lessov CN, Burkhart-Kasch S, Zhang G, Bunzow JR, Fang Y, Gerhardt GA, Grandy DK, Low MJ. Locomotor activity in D2 dopamine receptor-deficient mice is determined by gene dosage, genetic background, and developmental adaptations. *J Neurosci*. 1998 May 1; 18(9):3470-9.
- Kelly MA, Rubinstein M, Asa SL, Zhang G, Saez C, Bunzow JR, Allen RG, Hnasko R, Ben-Jonathan N, Grandy DK, Low MJ. Pituitary lactotroph hyperplasia and chronic hyperprolactinemia in dopamine D2 receptor-deficient mice. *Neuron*. 1997 Jul; 19(1):103-13.
- Kennedy RT, Jones SR, Wightman RM. Dynamic observation of dopamine autoreceptor effects in rat striatal slices. *J Neurochem*. 1992 Aug; 59(2):449-55.
- Kenny PJ. Common cellular and molecular mechanisms in obesity and drug addiction. *Nat Rev Neurosci*. 2011 Oct 20;12(11):638-51.
- Khan ZU, Mrzljak L, Gutierrez A, de la Calle A, Goldman-Rakic PS. Prominence of the dopamine D2 short isoform in dopaminergic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jun 23; 95(13):7731-6.
- Kim JH, Austin JD, Tanabe L, Creekmore E, and Vezina P (2005) Activation of group II mGlu receptors blocks the enhanced drug taking induced by previous exposure to amphetamine. *Eur J Neurosci* **21**:295–300.
- Kimmel HL, Joyce AR, Carroll FI, Kuhar MJ (2001) Dopamine D1 and D2 receptors influence dopamine transporter synthesis and degradation in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 298: 129–140
- Kitai ST, Shepard PD, Callaway JC, Scroggs R. Afferent modulation of dopamine neuron firing patterns. *Curr Opin Neurobiol*. 1999 Dec; 9(6):690-7. Review.
- Knowlton BJ, Mangels JA, Squire LR. A neostriatal habit learning system in humans. *Science*. 1996 Sep 6; 273(5280):1399-402.
- Koeltzow TE, Xu M, Cooper DC, Hu XT, Tonegawa S, Wolf ME, White FJ. Alterations in dopamine release but not dopamine autoreceptor function in dopamine D3 receptor mutant mice. *J Neurosci*. 1998 Mar 15; 18(6):2231-8. Review.
- Kolta MG, Shreve P, De Souza V, Uretsky NJ. Time course of the development of the enhanced behavioral and biochemical responses to amphetamine after pretreatment with amphetamine. *Neuropharmacology*. 1985 Sep; 24(9):823-9.
- Koob GF. Neurobiological substrates for the dark side of compulsivity in addiction. *Neuropharmacology*. 2009; 56 Suppl 1:18-31. Review.
- Kourrich S, Rothwell PE, Klug JR, and Thomas MJ (2007) Cocaine experience controls bidirectional synaptic plasticity in the nucleus accumbens. *J Neurosci* **27**:7921–7928.
- Kravitz AV, Freeze BS, Parker PR, Kay K, Thwin MT, Deisseroth K, Kreitzer AC. Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature*. 2010 Jul 29;466(7306):622-6.
- Kreiss DS, Bergstrom DA, Gonzalez AM, Huang KX, Sibley DR, Walters JR. Dopamine receptor agonist potencies for inhibition of cell firing correlate with dopamine D3 receptor binding affinities. *Eur J Pharmacol*. 1995 Apr 24; 277(2-3):209-14.
- Kreitzer AC, Malenka RC. Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron*. 2008 Nov 26;60(4):543-54. Review.
- Kreitzer AC, Malenka RC. Endocannabinoid-mediated rescue of striatal LTD and motor deficits in Parkinson's disease models. *Nature*. 2007 Feb 8;445(7128):643-7.
- Lacey MG, Mercuri NB, North RA. Dopamine acts on D2 receptors to increase potassium conductance in neurones of the rat substantia nigra zona compacta. *J Physiol*. 1987 Nov; 392:397-416.

- LaHoste GJ, Marshall JF. The role of dopamine in the maintenance and breakdown of D1/D2 synergism. *Brain Res.* 1993 May 14;611(1):108-16.
- Laruelle, M. et al. (1999) Increased dopamine transmission in schizophrenia: relationship to illness phases. *Biol. Psychiatry* 46, 56–72
- Lehéricy S, Benali H, Van de Moortele PF, Péligrini-Issac M, Waechter T, Ugurbil K, Doyon J. Distinct basal ganglia territories are engaged in early and advanced motor sequence learning. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Aug 30; 102(35):12566-71.
- Le Moine C, Bloch B. Expression of the D3 dopamine receptor in peptidergic neurons of the nucleus accumbens: comparison with the D1 and D2 dopamine receptors. *Neuroscience.* 1996 Jul; 73(1):131-43.
- Lee B, London ED, Poldrack RA, Farahi J, Nacca A, Monterosso JR, Mumford JA, Bokarius AV, Dahlbom M, Mukherjee J, Bilder RM, Brody AL, Mandelkern MA. Striatal dopamine d2/d3 receptor availability is reduced in methamphetamine dependence and is linked to impulsivity. *J Neurosci.* 2009 Nov 25; 29(47):14734-40.
- Lee FJ, Pei L, Moszczynska A, Vukusic B, Fletcher PJ, Liu F. Dopamine transporter cell surface localization facilitated by a direct interaction with the dopamine D2 receptor. *EMBO J.* 2007 Apr 18; 26(8):2127-36.
- Lejeune F, Millan MJ. Activation of dopamine D3 autoreceptors inhibits firing of ventral tegmental dopaminergic neurones in vivo. *Eur J Pharmacol.* 1995 Mar 14; 275(3):R7-9.
- Lett BT. Repeated exposures intensify rather than diminish the rewarding effects of amphetamine, morphine, and cocaine. *Psychopharmacology (Berl).* 1989; 98(3):357-62.
- Lévesque M, Parent A. The striatofugal fiber system in primates: a reevaluation of its organization based on single-axon tracing studies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Aug 16; 102(33):11888-93.
- L'hirondel M, Chéramy A, Godeheu G, Artaud F, Saiardi A, Borrelli E, Glowinski J. Lack of autoreceptor-mediated inhibitory control of dopamine release in striatal synaptosomes of D2 receptor-deficient mice. *Brain Res.* 1998 May 11; 792(2):253-62.
- Lisman JE, Grace AA. The hippocampal-VTA loop: controlling the entry of information into long-term memory. *Neuron.* 2005 Jun 2; 46(5):703-13. Review.
- Ljungberg T, Apicella P, Schultz W. Responses of monkey dopamine neurons during learning of behavioral reactions. *J Neurophysiol.* 1992 Jan; 67(1):145-63.
- Lodge DJ and Grace AA (2008) Amphetamine activation of hippocampal drive of mesolimbic dopamine neurons: a mechanism of behavioral sensitization. *J Neurosci* **28**:7876–7882.
- Maina FK, Mathews TA. A functional fast scan cyclic voltammetry assay to characterize dopamine D2 and D3 autoreceptors in the mouse striatum. *ACS Chem Neurosci.* 2010 Mar 12; 1(6):450-462.
- Maldonado R, Saiardi A, Valverde O, Samad TA, Roques BP, Borrelli E. Absence of opiate rewarding effects in mice lacking dopamine D2 receptors. *Nature.* 1997 Aug 7;388(6642):586-9.
- Malenka RC, Bear MF. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron.* 2004 Sep 30;44(1):5-21. Review.
- Mameli M, Balland B, Luja'n R, and Lu'scher C (2007) Rapid synthesis and synaptic insertion of GluR2 for mGluR-LTD in the ventral tegmental area. *Science* 317: 530–533.
- Marsden C. Dopamine: the rewarding years. *British Journal of Pharmacology.* January 2, 2006; 147:S136-S144.
- Martel P, Leo D, Fulton S, Bérard M, Trudeau LE. Role of Kv1 potassium channels in regulating dopamine release and presynaptic D2 receptor function. *PLoS One.* 2011; 6(5):e20402.
- Martinez D, Slifstein M, Narendran R, Foltin RW, Broft A, Hwang DR, Perez A, Abi-Dargham A, Fischman MW, Kleber HD, Laruelle M. Dopamine D1 receptors in cocaine dependence measured with PET and the choice to self-administer cocaine. *Neuropsychopharmacology.* 2009 Jun; 34(7):1774-82.
- Matsuda W, Furuta T, Nakamura KC, Hioki H, Fujiyama F, Arai R, Kaneko T. Single nigrostriatal dopaminergic neurons form widely spread and highly dense axonal arborizations in the neostriatum. *J Neurosci.* 2009 Jan 14; 29(2):444-53.
- Mattson BJ, Koya E, Simmons DE, Mitchell TB, Berkow A, Crombag HS, and Hope BT (2008) Context-specific sensitization of cocaine-induced locomotor activity and associated neuronal ensembles in rat nucleus accumbens. *Eur J Neurosci* 27:202– 212.



- Maurice N, Mercer J, Chan CS, Hernandez-Lopez S, Held J, Tkatch T, Surmeier DJ. D2 dopamine receptor-mediated modulation of voltage-dependent Na<sup>+</sup> channels reduces autonomous activity in striatal cholinergic interneurons. *J Neurosci*. 2004 Nov 17;24(46):10289-301.
- Mayer A, Limberger N, Starke K. Transmitter release patterns of noradrenergic, dopaminergic and cholinergic axons in rabbit brain slices during short pulse trains, and the operation of presynaptic autoreceptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1988 Dec; 338(6):632-43.
- Mayfield RD, Zahniser NR. Dopamine D2 receptor regulation of the dopamine transporter expressed in *Xenopus laevis* oocytes is voltage-independent. *Mol Pharmacol*. 2001 Jan;59(1):113-21.
- McClure SM, Daw ND, Montague PR. A computational substrate for incentive salience. *Trends Neurosci*. 2003 Aug;26(8):423-8. Review.
- McCullough LD, Cousins MS, Salamone JD. The role of nucleus accumbens dopamine in responding on a continuous reinforcement operant schedule: a neurochemical and behavioral study. *Pharmacol Biochem Behav*. 1993 Nov; 46(3):581-6.
- Meador-Woodruff JH, Mansour A. A. E. Bennett Award paper. Expression of the dopamine D2 receptor gene in brain. *Biol Psychiatry*. 1991 Nov 15; 30(10):985-1007.
- Meiergerd SM, Patterson TA, Schenk JO. D2 receptors may modulate the function of the striatal transporter for dopamine: kinetic evidence from studies in vitro and in vivo. *J Neurochem*. 1993 Aug;61(2):764-7.
- Meller E, Bohmaker K, Goldstein M, Basham DA. Evidence that striatal synthesis-inhibiting autoreceptors are dopamine D3 receptors. *Eur J Pharmacol*. 1993 Nov 2; 249(1):R5-6.
- Mercuri NB, Saiardi A, Bonci A, Picetti R, Calabresi P, Bernardi G, Borrelli E. Loss of autoreceptor function in dopaminergic neurons from dopamine D2 receptor deficient mice. *Neuroscience*. 1997 Jul; 79(2):323-7.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev*. 1998 Jan; 78(1):189-225. Review.
- Miyachi S, Hikosaka O, Lu X. Differential activation of monkey striatal neurons in the early and late stages of procedural learning. *Exp Brain Res*. 2002 Sep; 146(1):122-6.
- Miyachi S, Hikosaka O, Miyashita K, Kárádi Z, Rand MK. Differential roles of monkey striatum in learning of sequential hand movement. *Exp Brain Res*. 1997 Jun; 115(1):1-5.
- Montague PR, Dayan P, Sejnowski TJ. A framework for mesencephalic dopamine systems based on predictive Hebbian learning. *J Neurosci*. 1996 Mar 1; 16(5):1936-47. Review.
- Montmayeur JP, Bausero P, Amlaiky N, Maroteaux L, Hen R, Borrelli E. Differential expression of the mouse D2 dopamine receptor isoforms. *FEBS Lett*. 1991 Jan 28; 278(2):239-43.
- Morelli M, Mennini T, Di Chiara G. Nigral dopamine autoreceptors are exclusively of the D2 type: quantitative autoradiography of [125I]iodosulpride and [125I]SCH 23982 in adjacent brain sections. *Neuroscience*. 1988 Dec; 27(3):865-70.
- Morgan D, Grant KA, Gage HD, Mach RH, Kaplan JR, Prioleau O, Nader SH, Buchheimer N, Ehrenkaufer RL, Nader MA. Social dominance in monkeys: dopamine D2 receptors and cocaine self-administration. *Nat Neurosci*. 2002 Feb; 5(2):169-74.
- Nedergaard S, Flatman JA, Engberg I. Nifedipine- and omega-conotoxin-sensitive Ca<sup>2+</sup> conductances in guinea-pig substantia nigra pars compacta neurones. *J Physiol*. 1993 Jul; 466:727-47.
- Nelson CL, Wetter JB, Milovanovic M, and Wolf ME (2007) The laterodorsal tegmentum contributes to behavioral sensitization to amphetamine. *Neuroscience* 146:41-49.
- Nemirovsky SI, Avale ME, Brunner D, Rubinstein M. Reward-seeking and discrimination deficits displayed by hypodopaminergic mice are prevented in mice lacking dopamine D4 receptors. *Synapse*. 2009 Nov; 63(11):991-7.
- Nicola SM, Surmeier J, Malenka RC. Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. *Annu Rev Neurosci*. 2000;23:185-215. Review.
- Nieuwboer A, Rochester L, Müncks L, Swinnen SP. Motor learning in Parkinson's disease: limitations and potential for rehabilitation. *Parkinsonism Relat Disord*. 2009 Dec; 15 Suppl 3:S53-8. Review.

- Nirenberg MJ, Vaughan RA, Uhl GR, Kuhar MJ, Pickel VM. The dopamine transporter is localized to dendritic and axonal plasma membranes of nigrostriatal dopaminergic neurons. *J Neurosci.* 1996 Jan 15; 16(2):436-47.
- Nissbrandt H, Ekman A, Eriksson E, Heilig M. Dopamine D3 receptor antisense influences dopamine synthesis in rat brain. *Neuroreport.* 1995 Feb 15; 6(3):573-6.
- Noaín D, Avale ME, Wedemeyer C, Calvo D, Peper M, Rubinstein M. Identification of brain neurons expressing the dopamine D4 receptor gene using BAC transgenic mice. *Eur J Neurosci.* 2006 Nov; 24(9):2429-38.
- Nyberg, S. et al. (1995) D2 dopamine receptor occupancy during low dose treatment with haloperidol decanoate. *Am. J. Psychiatry* 152, 173–178
- O'Brien CP. 2011. Adicción y abuso de drogas. Capítulo 24 de Goodman & Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 2012. Duodécima edición en castellano. Editor: Laurance L. Brunton. Editorial McGraw-HILL INTERAMERICANA EDITORES SA. ISBN: 978-607-15-0641-2. Traducido de Twelfth English Edition 2011 Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics. ISBN: 978-0-07-162442-8. Editor: Laurence L. Brunton. Editorial The MacGraw- Hill Companies, Inc.
- O'Brien CP, Childress AR, McLellan AT, Ehrman R. Classical conditioning in drug-dependent humans. *Ann N Y Acad Sci.* 1992 Jun 28; 654:400-15. Review.
- O'Hara CM, Uhland-Smith A, O'Malley KL, Todd RD. Inhibition of dopamine synthesis by dopamine D2 and D3 but not D4 receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996 Apr; 277(1):186-92.
- Okuma Y, Yanagisawa N. The clinical spectrum of freezing of gait in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2008; 23 Suppl 2:S426-30. Review. Erratum in: *Mov Disord.* 2008 Aug 15; 23(11):1639-40.
- Omelchenko N and Sesack SR (2005) Laterodorsal tegmental projections to identified cell populations in the rat ventral tegmental area. *J Comp Neurol* 483:217– 235.
- Omelchenko N and Sesack SR (2007) Glutamate synaptic inputs to ventral tegmental area neurons in the rat derive primarily from subcortical sources. *Neuroscience* 146:1259–1274. Onali P, Mosca E, Olanas MC. Presynaptic dopamine autoreceptors and second messengers controlling tyrosine hydroxylase activity in rat brain. *Neurochem Int.* 1992 Mar; 20 Suppl:89S-93S. Review.
- O'Neill C, Evers-Donnelly A, Nicholson D, O'Boyle KM, O'Connor JJ. D2 receptor-mediated inhibition of dopamine release in the rat striatum in vitro is modulated by CB1 receptors: studies using fast cyclic voltammetry. *J Neurochem.* 2009 Feb; 108(3):545-51.
- Paladini CA, Robinson S, Morikawa H, Williams JT, Palmiter RD. Dopamine controls the firing pattern of dopamine neurons via a network feedback mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Mar 4; 100(5):2866-71.
- Palij P, Bull DR, Sheehan MJ, Millar J, Stamford J, Kruk ZL, Humphrey PP. Presynaptic regulation of dopamine release in corpus striatum monitored in vitro in real time by fast cyclic voltammetry. *Brain Res.* 1990 Feb 12; 509(1):172-4.
- Palmiter RD. Dopamine signaling in the dorsal striatum is essential for motivated behaviors: lessons from dopamine-deficient mice. *Ann N Y Acad Sci.* 2008; 1129:35-46. Review.
- Paquet M, Tremblay M, Soghomonian JJ, Smith Y. AMPA and NMDA glutamate receptor subunits in midbrain dopaminergic neurons in the squirrel monkey: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *J Neurosci.* 1997 Feb 15; 17(4):1377-96.
- Parsons LH, Schad CA, Justice JB Jr. Co-administration of the D2 antagonist pimozide inhibits up-regulation of dopamine release and uptake induced by repeated cocaine. *J Neurochem.* 1993 Jan; 60(1):376-9.
- Patel J, Trout SJ, Kruk ZL. Regional differences in evoked dopamine efflux in brain slices of rat anterior and posterior caudate putamen. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1992 Sep; 346(3):267-76.
- Paulson PE, Robinson TE. Amphetamine-induced time-dependent sensitization of dopamine neurotransmission in the dorsal and ventral striatum: a microdialysis study in behaving rats. *Synapse.* 1995 Jan; 19(1):56-65.
- Peciña S, Cagniard B, Berridge KC, Aldridge JW, Zhuang X. Hyperdopaminergic mutant mice have higher "wanting" but not "liking" for sweet rewards. *J Neurosci.* 2003 Oct 15; 23(28):9395-402.

- Pellizzari EH, Barontini M, Figuerola Mde L, Cigorraga SB, Levin G. Possible autocrine enkephalin regulation of catecholamine release in human pheochromocytoma cells. *Life Sci.* 2008 Sep 12; 83(11-12):413-20.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods.* 1985 Aug; 14(3):149-67.
- Phillips PE, Hancock PJ, Stamford JA. Time window of autoreceptor-mediated inhibition of limbic and striatal dopamine release. *Synapse.* 2002 Apr; 44(1):15-22.
- Phillips PE, Stamford JA. Differential recruitment of N-, P- and Q-type voltage-operated calcium channels in striatal dopamine release evoked by 'regular' and 'burst' firing. *Brain Res.* 2000 Nov 24; 884(1--2):139-46.
- Phillips PE, Stuber GD, Heien ML, Wightman RM, Carelli RM. Subsecond dopamine release promotes cocaine seeking. *Nature.* 2003 Apr 10; 422(6932):614-8. Erratum in: *Nature.* 2003 May 22; 423(6938):461
- Phillips TJ, Brown KJ, Burkhart-Kasch S, Wenger CD, Kelly MA, Rubinstein M, Grandy DK, Low MJ. Alcohol preference and sensitivity are markedly reduced in mice lacking dopamine D2 receptors. *Nat Neurosci.* 1998 Nov;1(7):610-5.
- Pierce RC, Kalivas PW. A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Res Brain Res Rev.* 1997 Oct; 25(2):192-216. Review.
- Pierce RC, Bell K, Duffy P, and Kalivas PW (1996a) Repeated cocaine augments excitatory amino acid transmission in the nucleus accumbens only in rats having developed behavioral sensitization. *J Neurosci* **16**:1550–1560.
- Pierce RC, Born B, Adams M, and Kalivas PW (1996b) Repeated intra-ventral tegmental area administration of SKF-38393 induces behavioral and neurochemical sensitization to a subsequent cocaine challenge. *J Pharmacol Exp Ther* **278**: 384–392.
- Pisa M. Motor somatotopy in the striatum of rat: manipulation, biting and gait. *Behav Brain Res.* 1988 Jan; 27(1):21-35.
- Pontieri FE, Tanda G, Orzi F, Di Chiara G. Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs. *Nature.* 1996 Jul 18; 382(6588):255-7.
- Post RM, Weiss SR, and Pert A (1992) Sensitization and kindling effects of chronic cocaine administration, in *Cocaine: Pharmacology, Physiology and Clinical Strategies* (Lakoski JM, Galloway MP, and White FJ eds) pp 115–161, CRC Press, Ann Arbor, MI.
- Post RM, Rose H. Increasing effects of repetitive cocaine administration in the rat. *Nature.* 1976 Apr 22; 260(5553):731-2. No abstract available.
- Pothos EN, Przedborski S, Davila V, Schmitz Y, Sulzer D. D2-Like dopamine autoreceptor activation reduces quantal size in PC12 cells. *J Neurosci.* 1998 Aug 1; 18(15):5575-85.
- Quarta D, Borycz J, Solinas M, Patkar K, Hockemeyer J, Ciruela F, Lluís C, Franco R, Woods AS, Goldberg SR, Ferré S. Adenosine receptor-mediated modulation of dopamine release in the nucleus accumbens depends on glutamate neurotransmission and N-methyl-D-aspartate receptor stimulation. *J Neurochem.* 2004 Nov; 91(4):873-80.
- Ramchandani VA, Umhau J, Pavon FJ, Ruiz-Velasco V, Margas W, Sun H, Damadzic R, Eskay R, Schoor M, Thorsell A, Schwandt ML, Sommer WH, George DT, Parsons LH, Herscovitch P, Hommer D, Heilig M. A genetic determinant of the striatal dopamine response to alcohol in men. *Mol Psychiatry.* 2011 Aug; 16(8):809-17. doi: 10.1038/mp.2010.56.
- Redgrave P, Vautrelle N, Reynolds JN. Functional properties of the basal ganglia's re-entrant loop architecture: selection and reinforcement. *Neuroscience.* 2011 Dec 15; 198:138-51. Review.
- Redgrave P, Rodriguez M, Smith Y, Rodriguez-Oroz MC, Lehericy S, Bergman H, Agid Y, DeLong MR, Obeso JA. Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: implications for Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci.* 2010 Nov; 11(11):760-72.
- Redgrave P, Gurney K. The short-latency dopamine signal: a role in discovering novel actions? *Nat Rev Neurosci.* 2006 Dec; 7(12):967-75. Review.

- Redgrave P, Prescott TJ, Gurney K. The basal ganglia: a vertebrate solution to the selection problem? *Neuroscience*. 1999; 89(4):1009-23. Review.
- Reid MS and Berger SP (1996) Evidence for sensitization of cocaine-induced nucleus accumbens glutamate release. *Neuroreport* 7:1325–1329.
- Rice ME, Patel JC, Cragg SJ. Dopamine release in the basal ganglia. *Neuroscience*. 2011 Dec 15; 198:112-37. Review.
- Rice ME, Cragg SJ. Nicotine amplifies reward-related dopamine signals in striatum. *Nat Neurosci*. 2004 Jun; 7(6):583-4.
- Rice ME, Cragg SJ, Greenfield SA. Characteristics of electrically evoked somatodendritic dopamine release in substantia nigra and ventral tegmental area in vitro. *J Neurophysiol*. 1997 Feb; 77(2):853-62.
- Richelson E. Neuroleptic affinities for human brain receptors and their use in predicting adverse effects. *J Clin Psychiatry*. 1984 Aug; 45(8):331-6.
- Richfield EK, Penney JB, Young AB. Anatomical and affinity state comparisons between dopamine D1 and D2 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*. 1989; 30(3):767-77.
- Risinger FO, Freeman PA, Rubinstein M, Low MJ, Grandy DK. Lack of operant ethanol self-administration in dopamine D2 receptor knockout mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2000 Oct; 152(3):343-50.
- Robbins TW, Brown VJ. The role of the striatum in the mental chronometry of action: a theoretical review. *Rev Neurosci*. 1990 Oct-Dec; 2(4):181-214. No abstract available.
- Robinson TE and Becker JB (1986) Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain Res* 396:157–198.
- Roitman MF, Stuber GD, Phillips PE, Wightman RM, Carelli RM. Dopamine operates as a subsecond modulator of food seeking. *J Neurosci*. 2004 Feb 11; 24(6):1265-71.
- Ronken E, Mulder AH, Schoffemeer AN. Interacting presynaptic kappa-opioid and GABAA receptors modulate dopamine release from rat striatal synaptosomes. *J Neurochem*. 1993 Nov; 61(5):1634-9.
- Roth RH, Walters JR, Murrin LC, Morgenroth VH 3rd. Dopamine neurons: role of impulse flow and presynaptic receptors in the regulation of tyrosine hydroxylase. *Psychopharmacol Bull*. 1975 Oct; 11(4):8. No abstract available.
- Rouge-Pont F, Usiello A, Benoit-Marand M, Gonon F, Piazza PV, Borrelli E. Changes in extracellular dopamine induced by morphine and cocaine: crucial control by D2 receptors. *J Neurosci*. 2002 Apr 15; 22(8):3293-301.
- Saal D, Dong Y, Bonci A, and Malenka RC (2003) Drugs of abuse and stress trigger a common synaptic adaptation in dopamine neurons. *Neuron* 37:577–582.
- Salah RS, Kuhn DM, Galloway MP. Dopamine autoreceptors modulate the phosphorylation of tyrosine hydroxylase in rat striatal slices. *J Neurochem*. 1989 May; 52(5):1517-22.
- Salamone JD, Correa M, Farrar A, Mingote SM. Effort-related functions of nucleus accumbens dopamine and associated forebrain circuits. *Psychopharmacology (Berl)*. 2007 Apr; 191(3):461-82. Review.
- Salamone JD, Correa M, Mingote SM, Weber SM. Beyond the reward hypothesis: alternative functions of nucleus accumbens dopamine. *Curr Opin Pharmacol*. 2005 Feb; 5(1):34-41. Review.
- Salamone JD, Correa M. Motivational views of reinforcement: implications for understanding the behavioral functions of nucleus accumbens dopamine. *Behav Brain Res*. 2002 Dec 2; 137(1-2):3-25. Review.
- Salamone JD, Kurth P, McCullough LD, Sokolowski JD. The effects of nucleus accumbens dopamine depletions on continuously reinforced operant responding: contrasts with the effects of extinction. *Pharmacol Biochem Behav*. 1995 Mar; 50(3):437-43.
- Sano H, Yasoshima Y, Matsushita N, Kaneko T, Kohno K, Pastan I, Kobayashi K. Conditional ablation of striatal neuronal types containing dopamine D2 receptor disturbs coordination of basal ganglia function. *J Neurosci*. 2003 Oct 8; 23(27):9078-88.

- Schaeren-Wiemers N, Gerfin-Moser A. A single protocol to detect transcripts of various types and expression levels in neural tissue and cultured cells: in situ hybridization using digoxigenin-labelled cRNA probes. *Histochemistry*. 1993 Dec; 100(6):431-40.
- Schilström B, Yaka R, Argilli E, Suvarna N, Schumann J, Chen BT, Carman M, Singh V, Mailliard WS, Ron D, et al. (2006) Cocaine enhances NMDA receptor-mediated currents in ventral tegmental area cells via dopamine D5 receptor-dependent redistribution of NMDA receptors. *J Neurosci* 26:8549–8558.
- Schmidt EE, Taylor DS, Prigge JR, Barnett S, Capecchi MR. Illegitimate Cre-dependent chromosome rearrangements in transgenic mouse spermatids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Dec 5; 97(25):13702-7.
- Schmitz Y, Benoit-Marand M, Gonon F, Sulzer D. Presynaptic regulation of dopaminergic neurotransmission. *J Neurochem*. 2003 Oct; 87(2):273-89. Review.
- Schmitz Y, Schmauss C, Sulzer D. Altered dopamine release and uptake kinetics in mice lacking D2 receptors. *J Neurosci*. 2002 Sep 15; 22(18):8002-9.
- Schneider, W. & Chein, J. M. Controlled & automatic processing: behavior, theory, and biological mechanisms. *Cogn. Sci.* 27, 525–559 (2003).
- Schuldiner S. A molecular glimpse of vesicular monoamine transporters. *J Neurochem*. 1994 Jun; 62(6):2067-78. Review.
- Schultz W. Dopamine signals for reward value and risk: basic and recent data. *Behav Brain Funct*. 2010; Apr 23; 6:24. Review.
- Schultz W. Multiple dopamine functions at different time courses. *Annu Rev Neurosci*. 2007; 30:259-88. Review.
- Schultz W. Behavioral theories and the neurophysiology of reward. *Annu Rev Psychol*. 2006;57:87-115. Review.
- Schultz W, Tremblay L, Hollerman JR. Reward prediction in primate basal ganglia and frontal cortex. *Neuropharmacology*. 1998 Apr-May; 37(4-5):421-9. Review.
- Schultz W, Dayan P, Montague PR. A neural substrate of prediction and reward. *Science*. 1997; Mar 14; 275(5306):1593-9. Review.
- Schwab RS, Chafetz ME, Walker S. Control of two simultaneous voluntary motor acts in normals and in parkinsonism. *AMA Arch Neurol Psychiatry*. 1954 Nov; 72(5):591-8.
- Schwartz RK, Borta A. Analysis of behavioral asymmetries in the elevated plus-maze and in the T-maze. *J Neurosci Methods*. 2005 Feb 15; 141(2):251-60.
- Seeman P, Weinshenker D, Quirion R, Srivastava LK, Bhardwaj SK, Grandy DK, Premont RT, Sotnikova TD, Boksa P, El-Ghundi M, O'dowd BF, George SR, Perreault ML, Männistö PT, Robinson S, Palmiter RD, Talleiro T. Dopamine supersensitivity correlates with D2High states, implying many paths to psychosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Mar 1;102(9):3513-8.
- Seeman P. Dopamine receptors and the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Synapse*. 1987; 1(2):133-52. Review.
- Seeman P, Lee T. Antipsychotic drugs: direct correlation between clinical potency and presynaptic action on dopamine neurons. *Science*. 1975 Jun 20; 188(4194):1217-9.
- Seeman P, Van Tol HH. Dopamine receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci*. 1994 Jul; 15(7):264-70. Review.
- Sepehrizadeh Z, Bahrololoumi Shapourabadi M, Ahmadi S, Hashemi Bozchlou S, Zarrindast MR, and Sahebgharani M (2008) Decreased AMPA GluR2, but not GluR3, mRNA expression in rat amygdala and dorsal hippocampus following morphine-induced behavioural sensitization. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **35**: 1321–1330.
- Sesack SR, Aoki C, Pickel VM. Ultrastructural localization of D2 receptor-like immunoreactivity in midbrain dopamine neurons and their striatal targets. *J Neurosci*. 1994 Jan; 14(1):88-106.
- Shen W, Flajolet M, Greengard P, Surmeier DJ. Dichotomous dopaminergic control of striatal synaptic plasticity. *Science*. 2008 Aug 8; 321(5890):848-51.

- Shiffrin, R. M. & Schneider, W. Controlled and automatic human information processing. II. Perceptual learning, automatic attending, and a general theory. *Psychol. Rev.* 84, 1977, 127–190.
- Shinonaga Y, Takada M, and Mizuno N (1994) Topographic organization of collateral projections from the basolateral amygdaloid nucleus to both the prefrontal cortex and nucleus accumbens in the rat. *Neuroscience* **58**:389–397.
- Sibley DR, Monsma FJ Jr, McVittie LD, Gerfen CR, Burch RM, Mahan LC. Molecular neurobiology of dopamine receptor subtypes. *Neurochem Int.* 1992 Mar; 20 Suppl:17S-22S. Review.
- Silva NL, Bunney BS. Intracellular studies of dopamine neurons in vitro: pacemakers modulated by dopamine. *Eur J Pharmacol.* 1988 May 10; 149(3):307-15.
- Simon P, Dupuis R, Costentin J. Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. *Behav Brain Res.* 1994 Mar 31; 61(1):59-64.
- Simpson EM, Linder CC, Sargent EE, Davisson MT, Mobraaten LE, Sharp JJ. Genetic variation among 129 substrains and its importance for targeted mutagenesis in mice. *Nat Genet.* 1997 May; 16(1):19-27.
- Smith AD, Bolam JP. The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurones. *Trends Neurosci.* 1990 Jul; 13(7):259-65. Review.
- Sokoloff P, Giros B, Martres MP, Bouthenet ML, Schwartz JC. Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature.* 1990 Sep 13; 347(6289):146-51.
- Spielewoy C, Roubert C, Hamon M, Nosten-Bertrand M, Betancur C, Giros B. Behavioural disturbances associated with hyperdopaminergia in dopamine-transporter knockout mice. *Behav Pharmacol.* 2000 Jun; 11(3-4):279-90.
- Stamford JA, Kruk ZL, Palij P, Millar J. Diffusion and uptake of dopamine in rat caudate and nucleus accumbens compared using fast cyclic voltammetry. *Brain Res.* 1988b May 17; 448(2):381-5.
- Stamford JA, Kruk ZL, Millar J. Actions of dopamine antagonists on stimulated striatal and limbic dopamine release: an in vivo voltammetric study. *Br J Pharmacol.* 1988a Jul; 94(3):924-32.
- Starke K, Göthert M, Kilbinger H. Modulation of neurotransmitter release by presynaptic autoreceptors. *Physiol Rev.* 1989 Jul; 69(3):864-989. Review.
- Starke K, Reimann W, Zumstein A, Hertting G. Effect of dopamine receptor agonists and antagonists on release of dopamine in the rabbit caudate nucleus in vitro. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1978 Oct; 305(1):27-36.
- Steketee JD, Kalivas PW. Drug wanting: behavioral sensitization and relapse to drug-seeking behavior. *Pharmacol Rev.* 2011 Jun; 63(2):348-65. Review.
- Steketee JD (1998) Injection of SCH 23390 into the ventral tegmental area blocks the development of neurochemical but not behavioral sensitization to cocaine. *Behav Pharmacol* **9**:69–76.
- Strange PG. Antipsychotic drug action: antagonism, inverse agonism or partial agonism. *Trends Pharmacol Sci.* 2008 Jun; 29(6):314-21.
- Stuber GD, Roitman MF, Phillips PE, Carelli RM, Wightman RM. Rapid dopamine signaling in the nucleus accumbens during contingent and noncontingent cocaine administration. *Neuropsychopharmacology.* 2005 May; 30(5):853-63.
- Suaud-Chagny MF, Dugast C, Chergui K, Msghina M, Gonon F. Uptake of dopamine released by impulse flow in the rat mesolimbic and striatal systems in vivo. *J Neurochem.* 1995 Dec; 65(6):2603-11.
- Suaud-Chagny MF, Brun P, Buda M, Gonon F. Fast in vivo monitoring of electrically evoked dopamine release by differential pulse amperometry with untreated carbon fibre electrodes. *J Neurosci Methods.* 1992 Dec; 45(3):183-90.
- Sunahara RK, Guan HC, O'Dowd BF, Seeman P, Laurier LG, Ng G, George SR, Torchia J, Van Tol HH, Niznik HB. Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1. *Nature.* 1991 Apr 18; 350(6319):614-9.
- Svingos AL, Clarke CL, Pickel VM. Localization of the delta-opioid receptor and dopamine transporter in the nucleus accumbens shell: implications for opiate and psychostimulant cross-sensitization. *Synapse.*

1999 Oct; 34(1):1-10.

- Svingos AL, Chavkin C, Colago EE, Pickel VM. Major coexpression of kappa-opioid receptors and the dopamine transporter in nucleus accumbens axonal profiles. *Synapse*. 2001 Dec 1; 42(3):185-92.
- Tan S, Hermann B, Borrelli E. Dopaminergic mouse mutants: investigating the roles of the different dopamine receptor subtypes and the dopamine transporter. *Int Rev Neurobiol*. 2003; 54:145-97.
- Tang L, Todd RD, O'Malley KL. Dopamine D2 and D3 receptors inhibit dopamine release. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994 Aug; 270(2):475-9.
- Tepper JM, Abercrombie ED, Bolam JP. Basal ganglia macrocircuits. *Prog Brain Res*. 2007; 160:3-7. Review.
- Tepper JM, Bolam JP. Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Curr Opin Neurobiol*. 2004 Dec;14(6):685-92. Review.
- Tepper JM, Nakamura S, Young SJ, Groves PM. Autoreceptor-mediated changes in dopaminergic terminal excitability: effects of striatal drug infusions. *Brain Res*. 1984b Sep 10; 309(2):317-33.
- Tepper JM, Young SJ, Groves PM. Autoreceptor-mediated changes in dopaminergic terminal excitability: effects of increases in impulse flow. *Brain Res*. 1984a Sep 10; 309(2):309-16.
- Thanos PK, Michaelides M, Umegaki H, Volkow ND. D2R DNA transfer into the nucleus accumbens attenuates cocaine self-administration in rats. *Synapse*. 2008 Jul; 62(7):481-6.
- Thanos PK, Volkow ND, Freimuth P, Umegaki H, Ikari H, Roth G, Ingram DK, Hitzemann R. Overexpression of dopamine D2 receptors reduces alcohol self-administration. *J Neurochem*. 2001 Sep; 78(5):1094-103.
- Tiberi M, Jarvie KR, Silvia C, Falardeau P, Gingrich JA, Godinot N, Bertrand L, Yang-Feng TL, Fremeau RT Jr, Caron MG. Cloning, molecular characterization, and chromosomal assignment of a gene encoding a second D1 dopamine receptor subtype: differential expression pattern in rat brain compared with the D1A receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Sep 1; 88(17):7491-5.
- Tilson HA, Rech RH. Conditioned drug effects and absence of tolerance to d-amphetamine induced motor activity. *Pharmacol Biochem Behav*. 1973. 149-153.
- Tunstall MJ, Oorschot DE, Kean A, Wickens JR (2002) Inhibitory interactions between spiny projection neurons in the rat striatum. *J Neurophysiol* 88:1263-1269.
- Ungerstedt U, Arbuthnott GW. Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res*. 1970 Dec 18; 24(3):485-93.
- Ungless MA, Whistler JL, Malenka RC, and Bonci A (2001) Single cocaine exposure in vivo induces long-term potentiation in dopamine neurons. *Nature* 411:583-587.
- Ungless MA, Argilli E, and Bonci A (2010) Effects of stress and aversion on dopamine neurons: implications for addiction. *Neurosci Biobehav Rev* 35:151-156.
- Usiello A, Baik JH, Rougé-Pont F, Picetti R, Dierich A, LeMeur M, Piazza PV, Borrelli E. Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature*. 2000 Nov 9; 408(6809):199-203.
- Valerio A, Belloni M, Gorno ML, Tinti C, Memo M, Spano P. Dopamine D2, D3, and D4 receptor mRNA levels in rat brain and pituitary during aging. *Neurobiol Aging*. 1994 Nov-Dec; 15(6):713-9.
- Vallar L and Meldolesi J. Mechanisms of signal transduction at the dopamine D2 receptor. *Trends Pharmacol Sci*. 1989 Feb; 10(2):74-7. Review.
- Van Tol HH, Bunzow JR, Guan HC, Sunahara RK, Seeman P, Niznik HB, Civelli O. Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature*. 1991 Apr 18; 350(6319):610-4.
- Vanderschuren LJ, Everitt BJ. Drug seeking becomes compulsive after prolonged cocaine self-administration. *Science*. 2004 Aug 13; 305(5686):1017-9.
- Vegina P, Giovino AA, Wise RA, and Stewart J (1989) Environment-specific crosssensitization between the locomotor activating effects of morphine and amphetamine. *Pharmacol Biochem Behav* 32:581-584.
- Vegina P and Leyton M (2009) Conditioned cues and the expression of stimulant sensitization in animals and humans. *Neuropharmacology* 56 (Suppl 1):160-168.

- Vezina P (2004) Sensitization of midbrain dopamine neuron reactivity and the self-administration of psychomotor stimulant drugs. *Neurosci Biobehav Rev* 27: 827–839.
- Vezina P, Lorrain DS, Arnold GM, Austin JD, and Suto N (2002) Sensitization of midbrain dopamine neuron reactivity promotes the pursuit of amphetamine. *J Neurosci* 22:4654–4662.
- Vilaró MT, Palacios JM, Mengod G. Localization of m5 muscarinic receptor mRNA in rat brain examined by in situ hybridization histochemistry. *Neurosci Lett*. 1990 Jul 3; 114(2):154-9.
- Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Tomasi D. Addiction circuitry in the human brain. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2012 Feb 10; 52:321-36. Review.
- Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Tomasi D, Telang F. Addiction: beyond dopamine reward circuitry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Sep 13; 108(37):15037-42. Review.
- Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Tomasi D, Telang F, Baler R. Addiction: decreased reward sensitivity and increased expectation sensitivity conspire to overwhelm the brain's control circuit. *Bioessays*. 2010 Sep; 32(9):748-55. Review.
- Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Baler R, Telang F. Imaging dopamine's role in drug abuse and addiction. *Neuropharmacology*. 2009; 56 Suppl 1:3-8. Review.
- Volkow ND, Wang GJ, Telang F, Fowler JS, Logan J, Jayne M, Ma Y, Pradhan K, Wong C. Profound decreases in dopamine release in striatum in detoxified alcoholics: possible orbitofrontal involvement. *J Neurosci*. 2007 Nov 14; 27(46):12700-6.
- Volkow ND, Wang GJ, Telang F, Fowler JS, Logan J, Jayne M, Ma Y, Pradhan K, Wong C. Profound decreases in dopamine release in striatum in detoxified alcoholics: possible orbitofrontal involvement. *J Neurosci*. 2007 Nov 14; 27(46):12700-6.
- Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ. The addicted human brain: insights from imaging studies. *J Clin Invest*. 2003 May; 111(10):1444-51. Review.
- Volkow ND, Chang L, Wang GJ, Fowler JS, Ding YS, Sedler M, Logan J, Franceschi D, Gatley J, Hitzemann R, Gifford A, Wong C, Pappas N. Low level of brain dopamine D2 receptors in methamphetamine abusers: association with metabolism in the orbitofrontal cortex. *Am J Psychiatry*. 2001 Dec; 158(12):2015-21.
- Volkow ND, Fowler JS. Addiction, a disease of compulsion and drive: involvement of the orbitofrontal cortex. *Cereb Cortex*. 2000 Mar; 10(3):318-25. Review.
- Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Logan J, Gatley SJ, Wong C, Hitzemann R, Pappas NR. Reinforcing effects of psychostimulants in humans are associated with increases in brain dopamine and occupancy of D(2) receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999 Oct; 291(1):409-15.
- Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Logan J, Gatley SJ, Hitzemann R, Chen AD, Dewey SL, Pappas N. Decreased striatal dopaminergic responsiveness in detoxified cocaine-dependent subjects. *Nature*. 1997 Apr 24; 386(6627):830-3.
- Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Logan J, Hitzemann R, Ding YS, Pappas N, Shea C, Piscani K. Decreases in dopamine receptors but not in dopamine transporters in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res*. 1996 Dec; 20(9):1594-8.
- Volkow ND, Ding YS, Fowler JS, Wang GJ. Cocaine addiction: hypothesis derived from imaging studies with PET. *J Addict Dis*. 1996; 15(4):55-71. Review.
- Volkow ND, Ding YS, Fowler JS, Wang GJ, Logan J, Gatley JS, Dewey S, Ashby C, Liebermann J, Hitzemann R, et al. Is methylphenidate like cocaine? Studies on their pharmacokinetics and distribution in the human brain. *Arch Gen Psychiatry*. 1995 Jun; 52(6):456-63.
- Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Hitzemann R, Logan J, Schlyer DJ, Dewey SL, Wolf AP. Decreased dopamine D2 receptor availability is associated with reduced frontal metabolism in cocaine abusers. *Synapse*. 1993 Jun; 14(2):169-77.
- Voon, V., and Fox, S.H. (2007). Medication-related impulse control and repetitive behaviours in Parkinson disease. *Arch. Neurol*. 20, 484–492.
- Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat*



Protoc. 2007; 2(2):322-8.

- Wang JQ, McGinty JF (1997) Intrastratial injection of a muscarinic receptor agonist and antagonist regulates striatal neuropeptide mRNA expression in normal and amphetamine-treated rats. *Brain Res* 748:62–70.
- Wang Y, Xu R, Sasaoka T, Tonegawa S, Kung MP, Sankoorikal EB. Dopamine D2 long receptor-deficient mice display alterations in striatum-dependent functions. *J Neurosci*. 2000 Nov 15; 20(22):8305-14.
- Wang Z, Kai L, Day M, Ronesi J, Yin HH, Ding J, Tkatch T, Lovinger DM, Surmeier DJ. Dopaminergic control of corticostriatal long-term synaptic expression in medium spiny neurons is mediated by cholinergic interneurons. *Neuron*. 2006 May 4;50(3):443-52.
- Weintraub, D., Siderowf, A.D., Potenza, M.N., Goveas, J., Morales, K.H., Duda, J.E., Moberg, P.J., and Stern, M.B. (2006). Association of dopamine agonist use with impulse control disorders in Parkinson disease. *Arch. Neurol.* 63, 969–973.
- Welter M, Vallone D, Samad TA, Meziane H, Usiello A, Borrelli E. Absence of dopamine D2 receptors unmasks an inhibitory control over the brain circuitries activated by cocaine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Apr 17;104(16):6840-5.
- White FJ, Hu HT, Henry DJ, and Zhang XF (1995a) Neurophysiological alterations in the mesocorticolimbic dopamine system with repeated cocaine administration, in *The Neurobiology of Cocaine: Cellular and Molecular Mechanisms* (Hammer RP Jr ed) pp 99–119, CRC Press, New York.
- White FJ, Hu XT, Zhang XF, and Wolf ME (1995b) Repeated administration of cocaine or amphetamine alters neuronal responses to glutamate in the mesoaccumbens dopamine system. *J Pharmacol Exp Ther* 273:445–454.
- White FJ and Wang RY (1984) Electrophysiological evidence for A10 dopamine autoreceptor subsensitivity following chronic D-amphetamine treatment. *Brain Res* 309:283–292.
- Wickens JR, Budd CS, Hyland BI, Arbuthnott GW. Striatal contributions to reward and decision making: making sense of regional variations in a reiterated processing matrix. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 May; 1104:192-212. Epub 2007 Apr 7. Review.
- Wolf ME, White FJ, Nassar R, Brooderson RJ, Khansa MR. Differential development of autoreceptor subsensitivity and enhanced dopamine release during amphetamine sensitization. *J Pharmacol Exp Ther*. 1993 Jan; 264(1):249-55.
- Wolf ME, Roth RH. Autoreceptor regulation of dopamine synthesis. *Ann N Y Acad Sci*. 1990; 604:323-43. Review.
- Wonnacott S, Kaiser S, Mogg A, Soliakov L, Jones IW. Resynaptic nicotinic receptors modulating dopamine release in the rat striatum. *J Pharmacol*. 2000 Mar 30; 393(1-3):51-8.
- Wu Q, Reith ME, Walker QD, Kuhn CM, Carroll FI, Garris PA. Concurrent autoreceptor-mediated control of dopamine release and uptake during neurotransmission: an in vivo voltammetric study. *J Neurosci*. 2002 Jul 15; 22(14):6272-81.
- Xi ZX, Ramamoorthy S, Baker DA, Shen H, Samuvel DJ, and Kalivas PW (2002) Modulation of group II metabotropic glutamate receptor signaling by chronic cocaine. *J Pharmacol Exp Ther* **303**:608–615.
- Yamamoto K, Vernier P. The evolution of dopamine systems in chordates. *Front Neuroanat*. 2011 Mar 29; 5:21.
- Yan Z, Song WJ, Surmeier J. D2 dopamine receptors reduce N-type Ca<sup>2+</sup> currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a membrane-delimited, protein-kinase-C-insensitive pathway. *J Neurophysiol*. 1997 Feb;77(2):1003-15.
- Yin HH, Mulcare SP, Hilário MR, Clouse E, Holloway T, Davis MI, Hansson AC, Lovinger DM, Costa RM. Dynamic reorganization of striatal circuits during the acquisition and consolidation of a skill. *Nat Neurosci*. 2009 Mar; 12(3):333-41.
- Yin HH, Knowlton BJ. The role of the basal ganglia in habit formation. *Nat Rev Neurosci*. 2006 Jun; 7(6):464-76. Review.
- Yin HH, Knowlton BJ, Balleine BW. Inactivation of dorsolateral striatum enhances sensitivity to changes in the action-outcome contingency in instrumental conditioning. *Behav Brain Res*. 2006 Jan 30; 166(2):189-96.

- Yin HH, Ostlund SB, Knowlton BJ, Balleine BW. The role of the dorsomedial striatum in instrumental conditioning. *Eur J Neurosci.* 2005 Jul; 22(2):513-23.
- Yung KKL, Bolam JP, Smith AD, Hersch SM, Ciliax BJ, Levey AI (1995) Immunocytochemical localization of D1 and D2 dopamine receptors in the basal ganglia of the rat: light and electron microscopy. *Neuroscience* 65:709–730.
- Zhang H, Sulzer D. Regulation of striatal dopamine release by presynaptic auto- and heteroreceptors. *Basal Ganglia* 2012. Ahead of print.
- Zhang XF, Hu XT, White FJ, and Wolf ME (1997) Increased responsiveness of ventral tegmental area dopamine neurons to glutamate after repeated administration of cocaine or amphetamine is transient and selectively involves AMPA receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 281:699–706.
- Zhang H, Sulzer D. Glutamate spillover in the striatum depresses dopaminergic transmission by activating group I metabotropic glutamate receptors. *J Neurosci.* 2003 Nov 19; 23(33):10585-92.
- Zhang W, Yamada M, Gomeza J, Basile AS, Wess J. Multiple muscarinic acetylcholine receptor subtypes modulate striatal dopamine release, as studied with M1-M5 muscarinic receptor knock-out mice. *J Neurosci.* 2002 Aug 1; 22(15):6347-52.
- Zhou QY, Grandy DK, Thambi L, Kushner JA, Van Tol HH, Cone R, Pribnow D, Salon J, Bunzow JR, Civelli O. Cloning and expression of human and rat D1 dopamine receptors. *Nature.* 1990 Sep 6; 347(6288):76-80.
- Zhou FM, Liang Y, Dani JA. Endogenous nicotinic cholinergic activity regulates dopamine release in the striatum. *Nat Neurosci.* 2001 Dec; 4(12):1224-9.
- Zhuang X, Oosting RS, Jones SR, Gainetdinov RR, Miller GW, Caron MG, Hen R. Hyperactivity and impaired response habituation in hyperdopaminergic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Feb 13; 98(4):1982-7.
- Zigmond MJ, Berger TW, Grace AA, Stricker EM. Compensatory responses to nigrostriatal bundle injury. Studies with 6-hydroxydopamine in an animal model of parkinsonism. *Mol Chem Neuropathol.* 1989 Jun; 10(3):185-200. Review.
- Zweifel LS, Parker JG, Lobb CJ, Rainwater A, Wall VZ, Fadok JP, Darvas M, Kim MJ, Mizumori SJ, Paladini CA, Phillips PE, Palmiter RD. Disruption of NMDAR-dependent burst firing by dopamine neurons provides selective assessment of phasic dopamine-dependent behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 May 5; 106(18):7281-8.