



Facultad de Ciencias
Instituto de Fisiología

TESIS DE MAGÍSTER

Evaluación de la liberación fásica de dopamina en el Núcleo Accumbens en ratones con inhibición quimiogénica crónica.

Sr. Juan Francisco Solís Rodríguez

**PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS MENCION
NEUROCIENCIAS**

DIRECTORA : Dra. Angélica Escobar

CO-DIRECTOR : Dr. Ramón Sotomayor-Zárate

AÑO 2025

**ACREDITADA
NIVEL DE EXCELENCIA**

Gestión Institucional, Docencia de Pregrado
Investigación, Vinculación con el Medio y
Docencia de Postgrado

HASTA MARZO DE 2029



DEDICATORIA

En primera instancia, le dedico esta tesis a mi madre Francisca y a mi padre Hernán, y a mis hermanos pues no solo su amor infinito, sino su apoyo incondicional y creencia inquebrantable en mí, han sido un punto de apoyo digno de Arquímedes. Quisiera dedicarle este trabajo también a mis queridas amistades que han estado atentas a este viaje de exploración, ese entusiasmo me empujó cuando yo no tuve la entereza. En esa misma línea, se la dedico a Marian, quien ha visto los momentos más difíciles de este camino, por lo cual también mis agradecimientos son vastos, por no decir infinitos. No pueden quedar fuera de esta mención mis estudiantes de música, que siempre me han permitido un espacio en sus clases para introducir los fascinantes aspectos de la neurociencia que iba recolectando cada día, su inquietud también fue un motor de motivación. Esto último me lleva a dedicarle esta tesis a toda persona que sienta mucha curiosidad y crea que los límites de la especialización pueden ser rotos, esto es, artistas, científicos o sencillamente alguien con un oficio forjado por las incontables horas de práctica que su quehacer le pida. Dentro de esta categoría, dedicar esta investigación especialmente a quienes deciden enriquecer (o cambiar) su camino de conocimiento. Como saben algunas personas, mi origen académico son las artes, la música especialmente. Digo esto porque estudiando ciencias me he dado cuenta de que hacerse preguntas es un arte en sí mismo. Se hace evidente entonces, que esa -a la vez sencilla y compleja acción de preguntarse- se encuentra en el origen “filogenético” de las artes y ciencias; por lo tanto, la especialización que las ha separado en los últimos siglos es un artificio y, aunque tal vez no se note, este trabajo es parte de ese intento por deshacer ese artificio.

También le dedico esta tesis a mis compañeras y compañeros de Magíster con quienes compartimos incontables momentos de estudio intenso y estrés, pero también muchos momentos de distensión, todos estos factores dieron uno de los resultados más importantes de todo este proceso: las amistades que aquí nacieron.

Finalmente, quisiera dedicar todo este trabajo a mis amistades musicales que me siguieron apañando entre pruebas y experimentos con sus músicas. Esos ensayos, tocatas y conciertos también retratan la historia del espíritu que atravesó este viaje.

Juan Francisco Solís Rodríguez
3 de noviembre de 2025, Valparaíso

AGRADECIMIENTOS

Proyectos FONDECYT Regulares 120-0474 y 124-0141 otorgados al Dr. Ramón Sotomayor-Zárate.

Agradecimientos a la Dra(c). Victoria B. Velásquez por su inmensa ayuda en aprender la técnica de FSCV.

Proyecto FONDECYT Iniciación 11240331 otorgado a la Dra. Angélica Escobar.

Al programa de Magíster en Ciencias Biológicas mención Neurociencias quien otorgó la beca de arancel para el 2do año del programa y la beca para asistencia a congresos.

Al Centro de Neurobiología y Fisiopatología Integrativa por propiciar un trabajo colaborativo entre sus miembros.

A mi cotutor el Dr. Ramón Sotomayor-Zárate por su laboratorio y el ecosistema ahí.

A mi tutora la Dra. Angélica Escobar por todo y al laboratorio y mis compañeros.

INDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
ABREVIACIONES	8
1.- INTRODUCCIÓN	9
1.1 SISTEMA DOPAMINÉRGICO.....	9
1.1.2 Funciones	9
1.1.3 Neuronas dopaminérgicas	9
1.1.4 Tipos de receptores dopaminérgicos y función de los receptores D ₂ sobre la liberación de dopamina.....	9
1.1.5 Afinidad de receptores de dopamina D ₂	10
1.1.6 Remoción extracelular de dopamina: rol del DAT e interacción con D ₂	10
1.2 MODELO ANIMAL Y FARMACOLÓGICO DE TRASTORNO OBSESIVO COMPULSIVO (TOC) INDUCIDO POR TRATAMIENTO REPETIDO CON QUINPIROL.	11
1.3 TÉCNICA QUIMIOGENÉTICA COMO MODELO PARA INHIBIR NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DE UNA FORMA PARECIDA AL D ₂	12
1.4 VOLTAMETRÍA CÍCLICA DE BARRIDO RÁPIDO (FSCV) COMO UNA FORMA DE MEDIR LA FUNCIÓN DEL RECEPTOR D ₂ PRESINÁPTICO EN EL NAc.....	13
2.- HIPOTESIS:.....	14
La inhibición crónica de la actividad dopaminérgica modifica la función inhibitoria del autorreceptor D ₂	14
3.- OBJETIVOS	14
3.1 OBJETIVO GENERAL	14
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
4.- MATERIALES Y MÉTODOS.	15
4.1 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	15
4.2 ANIMALES Y MATERIALES	16
4.2.1 Animales	16
4.2.2 Virus adenoasociado	16
4.2.3 Drogas	16
4.3. MÉTODOS	16
4.3.1 Cirugía Estereotáxica para inyección de virus adenoasociado	16
4.3.2 Medición de actividad locomotora	17
4.3.3 Voltametria Cíclica de Barrido Rápido.....	17
4.3.4 Perfusión transcardíaca.....	18
4.3.5 Inmunofluorescencia Indirecta.....	18

5.-	RESULTADOS	19
5.1	VIRUS ADENOSASOCIADO FUE EXPRESADO EN NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DEL VTA	19
5.2	LA INHIBICIÓN CRÓNICA DE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DEL VTA A TRAVÉS DE QUIMIOGENÉTICA NO MODIFICÓ LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA.....	19
5.3	LA LIBERACIÓN FÁSICA BASAL DE DOPAMINA TIENE MAYOR VARIANZA EN RATONES CON INHIBICIÓN QUIMIOGENÉTICA CRÓNICA	20
5.4	EL TIEMPO DE RECAPTURA DE DOPAMINA TIENDE A SER MAYOR EN RATONES INHIBIDOS CRÓNICAMENTE	22
5.5	LA INHIBICIÓN CRÓNICA DE LA VÍA DOPAMINÉRGICA MESOLÍMBICA POR QUIMIOGENÉTICA TIENDE A PRODUCIR AUMENTO DEL EFECTO INHIBITORIO DE QNP SOBRE LA LIBERACIÓN DE DOPAMINA EN EL NAc.	24
5.6	CONCENTRACIONES BAJAS DE QNP PRODUCEN EFECTOS CONTRARIOS ENTRE RATONES CON INHIBICIÓN CRÓNICA Y CONTROLES	25
6.-	DISCUSIÓN	27
6.1	EFFECTOS DE LA INHIBICIÓN REPETIDA DE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS MESOLÍMBICAS SOBRE LA LOCOMOCIÓN	27
6.2	EFFECTOS DE LA INHIBICIÓN QUIMIOGENÉTICA CRÓNICA DE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS MESOLÍMBICAS SOBRE LA LIBERACIÓN Y RECAPTACIÓN (REMOCIÓN) DE DOPAMINA.	28
6.2.1	TAU y su relación con los transportadores de dopamina (DAT)	28
6.2.2	Porcentaje de inhibición.....	29
6.2.3	Liberación basal (sin QNP).....	29
7.-	CONCLUSIONES	29
8.-	LIMITACIONES Y PROYECCIONES FUTURAS	31
9.-	PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS	32
10.-	ANEXOS	33
11.-	FIGURAS SUPLEMENTARIAS	35
12.-	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

RESUMEN

Este trabajo buscó evaluar si existe un aumento en la sensibilidad de receptores de dopamina (D_2), en neuronas dopaminérgicas expuestas a niveles decrecientes de dopamina. El motivo de esta evaluación es encontrar un mecanismo sináptico que explique en parte la aparición de conductas compulsivas, como las presentadas en el trastorno obsesivo compulsivo (TOC). Previamente se encontró que ratas tratadas con quinpirol (QNP), un agonista de receptores D_2 , presentaron chequeo compulsivo, lo cual dio origen a un modelo farmacológico de TOC en ratas. En experimentos posteriores se encontró, a través de microdiálisis y voltametría cíclica de barrido rápido (FSCV), que tras el tratamiento crónico con QNP, los niveles tónicos y fásicos de dopamina disminuyeron, lo cual sugiere un rol para los receptores D_2 en el chequeo compulsivo, específicamente en la sensibilidad presináptica de estos. Para lograr la evaluación de tales receptores, en el presente estudio se inhibieron neuronas dopaminérgicas, y positivas para tirosina hidroxilasa (TH) en el área tegmental ventral (VTA) de ratones TH-Cre, durante 5 días seguidos mediante quimiogenética, utilizando la familia de receptores de diseño exclusivamente activado por drogas de diseño (DREADDs, por sus siglas en inglés), específicamente el receptor hM4Di. Con esta metodología se logra imitar el efecto del tratamiento crónico con QNP, pero exclusivamente sobre las neuronas dopaminérgicas que proyectan hacia el Nucleus Accumbens (NAc), sin activar los receptores postsinápticos. Luego, se realizó FSCV en NAc para evaluar si se cambia la liberación fásica de dopamina luego de la inhibición quimiogenética crónica. Para evaluar si la sensibilidad del autoreceptor D_2 se modifica luego del tratamiento, se aplicó QNP durante el FSCV. Se observó una disminución mayor de liberación de dopamina en las concentraciones más bajas de QNP en los ratones inhibidos crónicamente. Interesantemente, se observó un aumento de la liberación en tales concentraciones en los ratones controles, mientras que en los tratados quimiogenéticamente, hubo una disminución en la liberación a la concentración mínima que luego aumentó. Es posible que el efecto de inhibición crónica sea apreciable a dosis muy pequeñas de QNP, volviendo a la normalidad en concentraciones más altas. Se sugiere realizar experimentos con concentraciones aún menores y con otros agonistas. Nuestros resultados sugieren que la inhibición crónica de la actividad dopaminérgica sensibiliza los autoreceptores D_2 del NAc, requiriéndose experimentos conductuales para evaluar si este mecanismo contribuye o no al desarrollo de conductas compulsivas.

Palabras clave: receptores D_2 , DREADDs, disminución en dopamina, inhibición crónica.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate whether there is an increase in the sensitivity of dopamine (D₂) receptors in dopaminergic neurons exposed to decreasing levels of dopamine. The purpose of this evaluation is to find a synaptic mechanism that explains in part the occurrence of compulsive behaviors such as those that occur in the obsessive-compulsive disorder (OCD). Previously, it was found that rats treated with quinpirol (QNP), a D₂ receptor agonist, exhibited compulsive checking, leading to the development of a pharmacological model of OCD in rats. Subsequent experiments, using microdialysis and fast scanning cyclic voltammetry (FSCV), showed that after chronic treatment with QNP, tonic and phasic dopamine levels decreased, suggesting a role for D₂ receptors in compulsive checking, specifically in their presynaptic sensitivity. To evaluate these receptors, dopaminergic neurons, positive for tyrosine hydroxylase (TH) in the ventral tegmental area (VTA) of TH-Cre mice were inhibited for 5 consecutive days using chemogenetics, using the designer receptors exclusively activated by designer drugs (DREADDs), specifically the hM4Di receptor. This methodology achieves the effect of chronic QNP treatment but exclusively on dopaminergic neurons that project to the Nucleus Accumbens (NAc), without activating postsynaptic receptors. Next, FSCV was performed in the nucleus accumbens to assess whether phasic dopamine release changes after chronic chemogenetic inhibition. To assess whether D₂ autoreceptor sensitivity changes after treatment, QNP was applied during FSCV. A greater decrease in dopamine release was observed at the lowest QNP concentrations in chronically inhibited mice. Interestingly, an increase in release was observed at these concentrations in control mice, while in the chemogenetically treated mice, there was a decrease in release at the minimum concentration, which then increased. The chronic inhibition effect may be noticeable at very low doses of QNP, returning to normal at higher concentrations. Experiments with even lower concentrations and other agonists are suggested. Our results indicate that chronic inhibition of dopaminergic activity sensitizes NAc D₂ autoreceptors, requiring behavioral experiments to assess whether this mechanism contributes to the development of compulsive behaviors.

Key words: D₂ receptors, DREADDs, decrease in dopamine, chronic inhibition.

ABREVIACIONES

CRE	:	Enzima recombinasa
D ₂	:	Receptor de dopamina tipo y subtipo D ₂
DAT	:	Transportador de dopamina
DREADD	:	Receptor de Diseño Activado Exclusivamente por Droga de Diseño
FSCV	:	Voltametría Cíclica de Barrido Rápido
NAc	:	Núcleo Accumbens
QNP	:	Quinpirol (agonista D ₂)
SNc	:	Sustancia Nigra Pars Compacta
TH	:	Tirosina Hidroxilasa (Enzima limitante de la síntesis de catecolaminas)
VTA	:	Área Tegmental Ventral

1.- INTRODUCCIÓN

1.1 SISTEMA DOPAMINÉRGICO.

1.1.2 Funciones

La dopamina es un neurotransmisor que pertenece a la familia de las monoaminas. Este se asocia a diversas funciones en los mamíferos, entre ellas movimiento voluntario, alimentación, afecto, recompensa, sueño, atención, memoria de trabajo y aprendizaje (Beaulieu, 2011). La dopamina que se origina desde el área del tegmento ventral (VTA) ha sido relacionada con el procesamiento de la recompensa y el reforzamiento del aprendizaje (Surmeier et al., 2014; Grace, A.A, 2016; Gershman S. J & Uchida N, 2019; Berke, J.D, 2018).

1.1.3 Neuronas dopaminérgicas

A nivel central, en el mesencéfalo, existen 2 lugares en donde se concentra la mayoría de las neuronas que producen dopamina: la sustancia nigra pars compacta (SNc), y VTA. Se estiman entre 400.000 y 600.000 neuronas dopaminérgicas en el cerebro humano, lo cual representa tan solo el 0.0005% del total de neuronas del cerebro (Pakkenberg et al. 1991). En particular, el VTA tiene proyecciones dopaminérgicas hacia el núcleo accumbens (NAc) y se estima que el 60% de sus neuronas (en ratas) son dopaminérgicas (Margolis et al. 2006b, Swanson 1982). En este mismo sentido, tanto el VTA como la SNc tienen poblaciones heterogéneas de neuronas, incluyendo neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas como también dopaminérgicas que co-liberan glutamato (EL Mestikawy et al., 2011) o GABA (Tritsch et al., 2012). Esta heterogeneidad neuroquímica podría contribuir a diferencias de conducta en ratones y ratas, lo que se debe considerar al hacer generalizaciones entre ambas especies, además nos da un panorama de la citoarquitectura del VTA. Para ilustrar la complejidad de los circuitos dopaminérgicos y sus posibles efectos conductuales, revisar Fields et al., (2007) donde se pueden observar las distintas proyecciones dopaminérgicas desde el VTA de ratas. Además de la complejidad en la circuitería de las proyecciones dopaminérgicas, para comprender mejor las diversas funciones de las neuronas dopaminérgicas, es útil considerar las formas de disparo que tienen estas neuronas. Desde la literatura pertinente, se han registrado *in vivo*, 3 patrones de actividad en las neuronas dopaminérgicas de ratas: uno inactivo (hiperpolarizado), uno tónico o lento (2-10 Hz) y uno fásico (<10 Hz) (Grace et al., 2007). Estos patrones de actividad se han correlacionado con diversos fenómenos en distintos niveles. En el caso del (disparo) fásico, las correlaciones conductuales han sido señales de recompensa, motivacionalmente relevantes o de alerta (Schultz, 2007). Desde el punto de vista de los niveles de dopamina, la convención es que el disparo tónico tiene la función de mantener estos niveles estables, mientras que el disparo fásico los aumenta en tiempos muy cortos, por lo cual se ha propuesto que median el error de predicción para recompensas anticipadas (Schultz, 2000)

1.1.4 Tipos de receptores dopaminérgicos y función de los receptores D₂ sobre la liberación de dopamina

En los mamíferos, se han descrito 5 tipos de receptores de dopamina, que por sus efectos de excitación o inhibición de la célula en la que se expresan, se subdividen en dos grupos: los D₁, cuyos subtipos son D₁ y D₅, están acoplados a proteína Gs. Por su parte, los D₂, cuyos subtipos son D₂, D₃ y D₄ están acoplados a la proteína Gi. En esta tesis, nos centramos en el subtipo D₂, los cuales pueden ser, a diferencia de la subcategoría D₁, tanto heteroreceptores (postsinápticos) como autorreceptores (presinápticos). Los D₂ sufren, splicing alternativo lo cual genera dos variantes de splicing: una variante corta o D_{2s} y otra variante larga, D_{2L} (Uziel et al., 2000; De Mei et al., 2009), ambas proteínas tienen una diferencia de 29 aminoácidos. Estudios en animales *knock out* de la versión D_{2s}, indican que esta variante funciona como autorreceptor (Bello et al., 2011; Anzalone et al., 2012), por

lo que su localización sería preferentemente presináptica, en los terminales dopaminérgicos, mientras que la variante D_{2L} se localizaría postsinápticamente. En esta tesis se estudia la función presináptica de D₂.

A nivel central, la mayor expresión de receptores D₂ se encuentra en el estriado, el núcleo accumbens y el tubérculo olfatorio. También en sustancia SNc, VTA, hipotálamo, áreas corticales, amígdala e hipocampo (Missale et al., 1998; Gerfen, 2000; Vallone et al., 2000). Como autorreceptores, estos regulan la transmisión de dopamina por distintos mecanismos tales como disminuir la probabilidad de liberación de dopamina (Benoit-Marand et al., 2001), disminuir la síntesis de dopamina (Wolf and Roth, 1990) y alterar la recaptación de dopamina (Truong et al., 2004). La regulación de liberación de dopamina ocurre en un rango que va entre varios cientos de milisegundos hasta varios segundos (Benoit-Marand et al., 2001). Existen varios mecanismos por medio de los cuales se logra la disminución de la liberación. Un mecanismo común es a través de la inhibición por las subunidades βX de la proteína G de los canales de calcio activados por voltaje (Herlitz et al., 1996) como los de tipo P/Q y los de tipo N (Cardozo y Bean, 1995), aunque también se ha visto que pueden inhibir la liberación a través de mecanismos independientes o río abajo, de los canales de calcio (Congar et al., 2002). También se ha visto una hiperpolarización vía canales de potasio dependientes de voltaje (Kv1.2) dado que el bloqueo de estos canales redujo la inhibición de liberación de dopamina en el estriado inducida por el quinpirole, un agonista D₂ (Fulton et al., 2011). Al parecer, distintos mecanismos regulan la liberación en los axones y las dendritas, ya que en el caso de la liberación somato dendrítica, esta regulación ocurre por medio de GIRK y no de Kv1.2 (Beckstead et al., 2007)

1.1.5 Afinidad de receptores de dopamina D₂

La dopamina activa los receptores dopaminérgicos con una afinidad que va desde concentraciones nanomolares a micromolares (Beaulieu, 2011). Sobre las diferencias de sensibilidad a los agonistas y antagonistas entre los distintos subtipos de receptores revisar (Missale et al., 1998; Sokoloff et al., 2006). Estudios tempranos (Richfield et al., 1989) sugieren un estado de afinidad mayor por parte de los D₂ (K_d = ~25 nM) que por parte de los D₁ (K_d = ~1 μM). Esto aportó en la construcción de un modelo basado en afinidad, en el cual los D₁ responderían a la liberación fásica (Grace and Bunney, 1984), mientras los D₂ a la liberación tónica (Grace and Bunney 1984). Sin embargo, este modelo ha sido cuestionado, dado que asume que las cinéticas de los receptores son idénticas y, por lo tanto, que los cursos temporales de cambios en concentración de dopamina y en la ocupación de receptores son iguales (Hunger et al., 2020). Además, se han hecho estudios que cuestionan la capacidad de saber realmente en qué estado de afinidad se encuentran los receptores (van Wieringen et al., 2013; Skinbjerg et al., 2012) y, por lo tanto, se acumula evidencia que cuestiona los efectos biológicos que tengan estos estados. Al parecer, más que diferencias de afinidad de los receptores, podría ser una diferencia en la cantidad de estos, lo que produce inhibición de dopamina inducida por bajas concentraciones de agonistas dopaminérgicos (Ford, 2014). Dilucidar esto último es parte del proyecto al cual tributa esta tesis.

1.1.6 Remoción extracelular de dopamina: rol del DAT e interacción con D₂

La remoción de neurotransmisores desde el espacio extracelular, es un mecanismo muy importante, tanto para evitar que el neurotransmisor continúe activando los receptores produciendo una desensibilización de los receptores y una consecuente refractariedad de la sinapsis, como también para reciclar el material y evitar el desgaste energético que implicaría volver a sintetizar neurotransmisores. Aunque existen enzimas que degradan dopamina (monoaminooxidasas, catecol-o-metiltransferasa), la recaptura es la principal manera que tienen las neuronas para mantener la regulación extracelular de dopamina (Benoit-Marand et al., 2000; Gonon et al., 2000; Jones et al., 1998)

Una vez que la dopamina es liberada al espacio sináptico, además de ligarse a sus respectivos receptores, es removida por los transportadores de dopamina (DAT) ubicados a nivel presináptico, en los terminales dopaminérgicos. El proceso de remoción de la dopamina es principalmente realizado por estos, siendo esta la razón de que su inhibición a través de drogas (e.j cocaína) provoque niveles de dopamina extracelular mayores que en estados basales. La evidencia muestra que la activación de receptores D₂ aumenta la actividad de DAT (Meiergerd et al., 1993; Parsons et al., 1993; Cass and Gerhardt, 1994). Además, como indica Lee (et al., 2007) se ha visto que los receptores D₂ interactúan en una forma proteína-proteína para físicamente translocar a DAT hacia la membrana, incrementando así la capacidad total de transporte de dopamina. Así, modificaciones en la actividad del receptor D₂ podrían influir en el nivel de remoción de dopamina por medio de un mecanismo que involucre a DAT y no solamente por inhibición de la neurona dopaminérgica presináptica, lo cual también es reafirmado por Dickinson (et al., 1999) quienes encontraron una función disminuida de DAT en ratones knock-out D₂.

1.2 MODELO ANIMAL Y FARMACOLÓGICO DE TRASTORNO OBSESIVO COMPULSIVO (TOC) INDUCIDO POR TRATAMIENTO REPETIDO CON QUINPIROL.

El TOC es una patología neuropsiquiátrica en la que un individuo presenta una o varias dimensiones de conducta problemáticas. Esta patología no solo afecta la vida personal de la persona que la padece, sino que también tiene un impacto en la sociedad. Su prevalencia se estima entre 1% a 3% globalmente (Pauls et al., 2014). Algunas de sus dimensiones son observables, como por ejemplo el chequeo compulsivo (ej. revisar varias veces los bolsillos) y otras no observables (ej. pensamientos intrusivos/obsesiones). Alteraciones en los circuitos dopaminérgicos subyacen a la generación de varias patologías neuropsiquiátricas. En el caso del TOC, se han desarrollado modelos explicativos que provienen de trabajos farmacológicos. Por ejemplo, Goodman (et al., 1990), introducen el sistema dopaminérgico en el mecanismo explicativo de por lo menos algunas dimensiones del TOC, dada la refractariedad al tratamiento por inhibidores de serotonina (SSRIs). Luego, McDougle (1997) muestra que el tratamiento en conjunto entre SSRI y drogas que afectan al sistema dopaminérgico, redujeron los síntomas del TOC en pacientes refractarios a los SSRI por si solos.

Para esta tesis utilizamos un modelo animal de inducción farmacológica de conductas tipo compulsivas, descrito por el grupo del Dr. Henry Szechtman en 1998, quienes inyectaron en ratas el agonista de receptores D₂ quinpirol (QNP), crónicamente (8-10 inyecciones cada 48-72 hrs), de forma intraperitoneal. Luego de cada día de inyección, las ratas fueron dejadas en una arena de medición de conducta donde se ubicaron en cuadrantes 5 objetos dispuestos siempre de la misma manera. El resultado fue una serie de comportamientos que se podían relacionar el comportamiento tipo chequeo compulsivo tal como una dimensión del TOC en humanos, proponiéndose así, el primer modelo animal de TOC con validez aparente para esta dimensión. Entre las actividades que se mostraron significativamente distintas a las de las ratas controles, se observó un interés exacerbado por ciertos objetos de la arena, una disminución de variabilidad en sus movimientos realizados en ese objeto de interés, como también disminución de visitas a otros objetos distintos. Junto con inducir chequeo compulsivo, las inyecciones repetidas de QNP inducen sensibilización locomotora (Szumlinski et al., 2000), que se define como un aumento progresivo en la actividad locomotora en respuesta a la misma dosis del fármaco (Pierce and Kalivas 2007). Con el tiempo, este modelo de TOC ha sido validado como un modelo de chequeo compulsivo. Esto también confirmó el modelo que Goodman et al., (1990) había propuesto anteriormente como una forma específica de TOC basada en el sistema dopaminérgico, que difería del modelo que venía explicando al TOC solamente desde alteraciones en la transmisión serotoninérgica, aunque tampoco son excluyentes, dado que ahora se comprende que cada uno se correlaciona con una forma distinta de TOC (o dimensión del TOC). Por ejemplo, Azaoka et al., (2019) pudieron rescatar inflexibilidad cognitiva en ratones, pero no la masticación compulsiva.

Estas evidencias fueron mostrando más claramente la relación que tiene el sistema dopaminérgico mesolímbico con conductas compulsivas. Sumado a esto, la inyección aguda de algunas drogas psicoestimulantes (e.j: anfetamina) elevan el nivel de dopamina en el núcleo accumbens (Di Chiara and Imperato 1988), mientras que la inyección repetida de anfetaminas en el VTA genera sensibilidad a la sustancia, es decir, luego de repetir las inyecciones, una inyección sistémica con la misma dosis de anfetaminas generó mayor liberación de dopamina en el NAc medido con microdiálisis (Vezina 1993) que en ratas no inyectadas previamente.

A partir de lo revisado hasta aquí, Escobar (et al., 2015) proponen que existe un mecanismo molecular compartido entre sensibilización locomotora por psicoestimulantes y por QNP, mediado por el receptor D₂. Sin embargo, como muestran Koeltzow (et al., 2003), a diferencia de los psicoestimulantes, dicha sensibilización por QNP no es producto del aumento de la liberación de dopamina en el NAc. Esta diferencia entre psicoestimulantes y agonistas D₂, conduce a preguntarse si las diferencias entre disparo tónico y fásico de dopamina son parte clave del efecto que tiene la manipulación de receptores D₂ en las conductas compulsivas. Se ha visto que la liberación tónica y fásica tienen distintas funciones. Por ejemplo, a la liberación tónica, se le ha atribuido, entre otras, la función de mantener niveles constantes de neurotransmisor en el espacio intersináptico (Floresco et al., 2003), mientras que a la liberación fásica se le ha atribuido, también entre otras, la función de señalar el error de predicción de recompensa positivo requerido para el aprendizaje por refuerzo (Schultz 2002; Grace y Bunney, 1984), lo cual tiene relación con la repetición de acciones para obtener recompensas. Es por esto último que se ha hipotetizado una relación entre alteraciones de esta función y la adicción a drogas (Konova et al., 2023), la cual tiene un componente compulsivo, por lo que se ha acuñado el concepto de “adicción conductual” (Holden, 2001). Visto así, se podría pensar en la compulsión como una adicción a la acción que se repite. Estas razones hacen a la liberación fásica un foco de interrogantes. En este sentido, se encontró que las ratas sensibilizadas a QNP mostraron una disminución en la liberación fásica de dopamina en el núcleo accumbens (NAc) y un aumento de la respuesta inhibitoria aguda del receptor D₂ sobre la liberación de dopamina (Escobar et al., 2015), sugiriendo que estas modificaciones podrían subyacer a la sensibilización locomotora y chequeo compulsivo inducido por QNP.

Nuestro laboratorio tiene resultados previos de ratones inyectados crónicamente con QNP, los cuales no presentaron diferencia de locomoción en comparación con los estudios clásicos en ratas (Szechtman et al., 1998; Escobar et al., 2015) A partir de todos estos antecedentes, nuestra pregunta de investigación es: **¿la disminución crónica de dopamina en el NAc induce sensibilización de la función inhibitoria del receptor D₂ presináptico?**

Para responder a esta pregunta de una manera independiente de la activación del receptor D₂, en esta tesis inhibimos crónicamente la actividad dopaminérgica mesolímbica por medio de quimiogenética.

1.3 TÉCNICA QUIMIOGENÉTICA COMO MODELO PARA INHIBIR NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DE UNA FORMA PARECIDA AL D₂.

La quimiogenética es una técnica que desde su inicio ha ganado terreno rápidamente en la investigación en neurociencia debido a que permite manipular el estado de excitación de las neuronas objetivo de forma bastante específica. La versión de esta técnica que se utilizó en este estudio es la de los DREADDs, ya que estos permiten un mayor grado de control que otras técnicas.

Como su nombre en inglés indica, los DREADDs (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs) son receptores de diseño que son activados por drogas diseñadas. Estos receptores podrán ser activados cuando los experimentadores lo necesiten, a través de un activador químico que no active a otros receptores endógenos. En otras palabras, se busca que los receptores tengan tres características: afinidad alta (nanomolar) al agente químico que lo activa, insensibilidad a su ligando endógeno y bajos niveles de actividad constitutiva (que el receptor se active en ausencia del ligando). La mayoría de los DREADDs son receptores metabotrópicos

derivados de los receptores muscarínicos, existiendo algunos acoplados a proteína Gq (estimuladores) o Gi (inhibitorios)

Los DREADDs son receptores cuya expresión puede ser inducida a través de un vector viral, como, por ejemplo, el virus adenoasociado (AAV) (Roth et al., 2016). Estos receptores imitan la función de los receptores acoplados a proteína G (GPCRs) endógenos, motivo que los hace idóneos para uno de los objetivos de este trabajo, que es imitar la función inhibitoria de los autorreceptores dopaminérgicos D₂, pero sin activarlos por sus ligandos o agonistas. Es por esto que se utilizarán hM4Di, los cuales son receptores muscarínicos humanos que se han modificado para que no unan su ligando endógeno. Al igual que D₂, el receptor hM4Di se acopla a proteína Gi, por lo que activan a canales rectificadores de entrada de potasio acoplados a proteína G (GIRKs) (Urban et al., 2014) ganando así, la capacidad de inducir una hiperpolarización de la neurona en la que se expresan (Armbruster et al., 2007). En otras palabras, se espera poder imitar la acción de los D₂ de una forma ecológicamente “más” válida y cercana a lo que ocurre fisiológicamente (desde el punto de vista del receptor D₂), en el sentido de que, sin activarlos, se produzca una disminución crónica en los niveles de dopamina.

Resultados preliminares de nuestro laboratorio indican que la expresión de hM4Di en neuronas de la vía dopaminérgica mesolímbica y luego la inhibición de su actividad de manera crónica inducen un efecto potenciador de la sensibilización locomotora inducida por QNP, sugiriendo que la inhibición de la actividad dopaminérgica mesolímbica previa al tratamiento con QNP sensibiliza la función de los receptores D₂ postsinápticos (en las MSN). Esto hace plausible sugerir que la función de D₂ presináptica también podría estar modificada.

1.4 VOLTAMETRÍA CÍCLICA DE BARRIDO RÁPIDO (FSCV) COMO UNA FORMA DE MEDIR LA FUNCIÓN DEL RECEPTOR D2 PRESINÁPTICO EN EL NAc.

En la voltametría cíclica de barrido rápido (Fast Scan Cyclic Voltammetry, FSCV) se aprovecha una propiedad característica de las catecolaminas: su rápida oxidación-reducción. Al oxidarse-reducirse, el paso de electrones entre grupos funcionales de la molécula genera una corriente de electrones, la cual es captada por el electrodo de carbono cercano al terminal dopaminérgico (Figura 1). Así, se deduce que la corriente captada será el reflejo de la concentración de dopamina liberada (Venton & Cao, 2021)

La voltametría es una técnica idónea para medir la liberación de dopamina fásica dada su alta resolución temporal, la cual permite medir la liberación de dopamina en el orden de microsegundos. Además, dado que podemos evaluar el efecto en el corte que contiene el NAc, podemos evaluar aquellos mecanismos que controlan la liberación como lo son los receptores D₂ presinápticos (o autoreceptores) por medio de la aplicación de drogas al baño en el que está inmerso el corte, sin activar o inibir los receptores ubicados en los cuerpos celulares de las neuronas dopaminérgicas. Dada la resolución temporal de la técnica, es posible medir parámetros de recaptura de dopamina, lo que no es posible con otras técnicas como la microdiálisis cerebral o la amperometría. Para inducir la liberación de dopamina se debe estimular eléctricamente por medio de un electrodo de estímulo, el que en la técnica *ex vivo* es puesto en el corte, a unos 100 μm del electrodo de registro, mientras que en la técnica *in vivo* se posiciona en los cuerpos celulares, usualmente en el VTA.

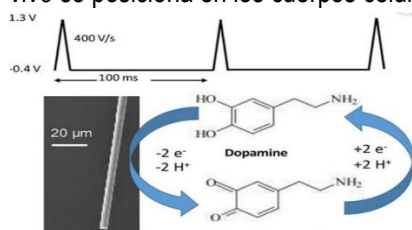


Figura 1. Tomada de Venton & y Cao, 2021. Esquema del funcionamiento de la voltametría cíclica de barrido rápido. En cada rampa de voltaje, de -0.4 V a 1.3 V, la dopamina es oxidada a dopamina o-quinona, el cambio de voltaje de vuelta (1.3V a -0.4V) produce la reducción nuevamente a dopamina, en el proceso de oxido reducción se mueven 2 electrones por molécula de dopamina creando una corriente que es captada por el electrodo de detección (electrodo de carbono), el flujo de electrones es proporcional a la cantidad de dopamina que haya en el medio.

2.- HIPOTESIS:

La inhibición crónica de la actividad dopaminérgica modifica la función inhibitoria del autorreceptor D₂.

3.- OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la función del autorreceptor D₂ sobre la liberación de dopamina en condición de inhibición crónica quimiogénica en ratones.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Inhibir crónicamente las neuronas dopaminérgicas mesolímbicas de ratones mediante quimiogénica.
- Medir la función inhibitoria del receptor D₂ sobre la liberación de dopamina por medio de FSCV en ratones con o sin inhibición crónica de la actividad dopaminérgica.

4.- MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizaron 4 grupos de ratones TH-CRE, ratones transgénicos que tienen la enzima CRE recombinasa en neuronas que expresan tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante de la síntesis de dopamina. 2 grupos fueron sometidos a cirugía estereotáxica para inyección viral (Grupo experimental: hM4Di/C21; Grupo Control: hM4Di/Sal) y los otros 2 grupos no fueron sometidos a cirugía estereotáxica (Grupo Control: sin hM4Di/C21 y Grupo control sin hM4Di/Sal) (Figura 2).

A los grupos inyectados con virus se les realizó una cirugía estereotáxica para inyectar el virus adenoasociado condicional, pAAV-hSyn-DIO-HA-hm4Di-IRES-mCitrine, en el VTA, que contiene la secuencia que codifica hM4Di y la proteína reportera mCitrine. Se esperó por al menos 21 días a que el virus infectara a las neuronas TH. Luego, se les administró, intraperitonealmente, C21 (agonista de los receptores hM4Di) una vez al día por 5 días. Después de cada inyección se dejó a los ratones en una caja de acrílico blanco (campo abierto u openfield, en inglés) durante 60 minutos para medir su locomoción y estadía en el centro o borde de la caja.

El procedimiento de FSCV se realizó únicamente en los grupos hM4Di/C21 y hM4D2/Sal. Al finalizar los 5 días de inyección intraperitoneal, se esperaron 24 horas más, luego de lo cual fueron anestesiados, sacrificados y sus cerebros extraídos para la adquisición de cortes coronales que contienen el NAc. Los cortes obtenidos fueron de 300 micras de grosor, se recogieron todos los cortes que contienen la comisura anterior como marcador anatómico del posicionamiento del NAc, es decir, cortes que abarcan desde 1.7-0.7 mm anterior a bregma. Obteniéndose, aproximadamente, 3 cortes en los cuales se realizó la voltimetría (FSCV). Durante el experimento se obtuvieron registros de liberación de dopamina en situación basal y luego se aplicaron concentraciones crecientes de quinpirol, agonista D₂.

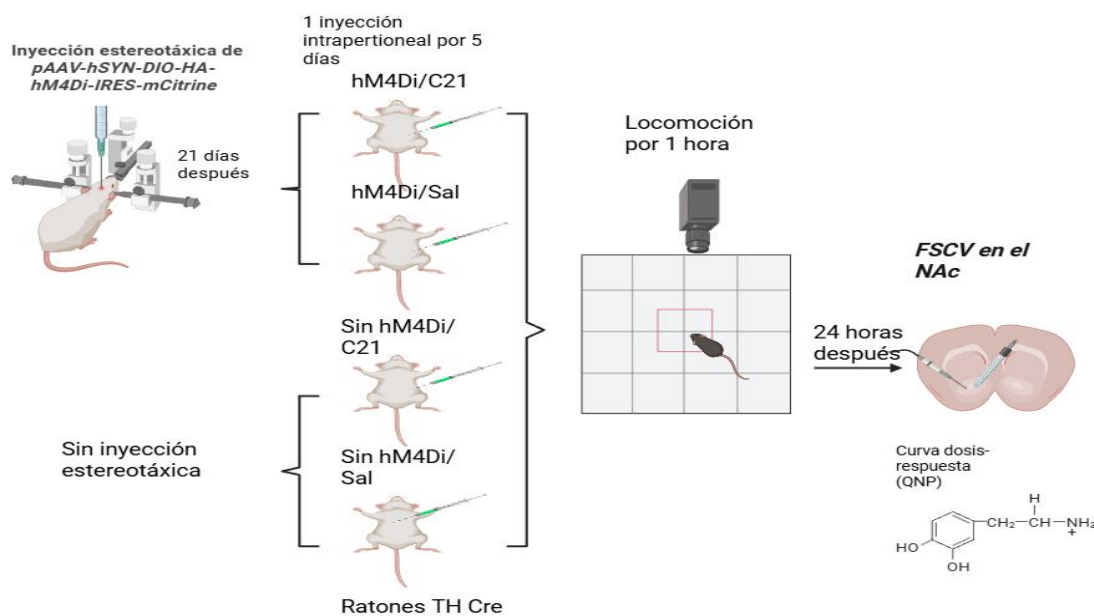


Figura 2. Diseño experimental. A 2 grupos de ratones TH-Cre se les inyectó estereotáxicamente el virus condicional AAV8-Syn-DIO-HA-hM4Di-IRES-mCitrine en el VTA (AP= -3.2 mm; ML=0.5 mm; DV=-4.2mm). A uno de estos grupos se les inyectó C21 (agonista hM4Di) y al otro, suero salino. Los otros 2 grupos de ratones TH-Cre no fueron inyectados estereotáxicamente, para ser asignados como grupos control. A uno de estos grupos se les inyectó C21 y al otro, suero salino. A los 4 grupos de ratones se les midió la locomoción por 1 hora después de cada inyección intraperitoneal, por 5 días. Para los experimentos de FSCV solo se utilizaron los ratones de los inyectados con hM4Di. Este procedimiento se realizó luego de 24 horas de la última inyección intraperitoneal de C21 o salino. Los ratones fueron anestesiados y sus cerebros extraídos para

obtener cortes coronales que incluyen el NAc (1.7-0.7 mm de Bregma). Durante el FSCV los cortes fueron incubados con concentraciones crecientes de QNP.

4.2 ANIMALES Y MATERIALES

4.2.1 Animales

Se utilizaron ratones transgénicos TH-Cre, 34 en total, de los cuales 10 fueron sometidos a voltametría, lográndose la obtención de datos en 6 de ellos, los que fueron obtenidos del bioterio de ratones transgénicos de la Universidad de Valparaíso. Los ratones fueron aclimatados en la sala de mantenimiento (EX303) del laboratorio del Dr. Pablo Moya por 21 días luego de la inyección estereotáxica, con un máximo de 5 ratones por caja en condiciones controladas de temperatura (25°C) bajo un ciclo luz/oscuridad de 12 h (luz encendida a las 07:00 h), con acceso ad libitum a alimento y agua. Tras su llegada, los ratones permanecieron 1 semana en la sala de mantención para su aclimatación.

Todos los procedimientos se realizaron siguiendo los principios de reducción en el número de animales y minimización del dolor, de acuerdo con las normativas del National Institutes of Health para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Los protocolos fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso (CBC-89-2023 y CBC 90-2023).

4.2.2 Virus adenoasociado

Se utilizó el virus adenoasociado serotipo 8 que contenía el plasmidio AAV8-Syn-DIO-hM4Di-IRES-mCitrine (ID 50467), con un título de 10^{13} vg/ml que fue obtenido de Addgene (repositorio de vectores sin fines de lucro, www.addgene.org). El virus fue alicuotado en volúmenes de 3µL y almacenado a -80°C hasta su uso durante la cirugía.

4.2.3 Drogas

C21 o 11-(1-piperaziny)-5H-dibenzo[b,e]diazepine. La droga C21 hidrocloreto (# 6422/10) fue adquirida en Tocris Bioscience y disuelta en suero fisiológico a una concentración de 0.6 mg/ml y administrada intraperitonealmente a los roedores a una dosis de 3.0mg/kg.

Quinpirol: quinpirol hidrocloreto, QNP, (#1061/10) fue adquirida de Tocris Bioscience, fue disuelta en agua milli Q a una concentración de 20µM y mantenida a -20°C hasta su uso. Durante los registros de FSCV fue añadido a la solución extracelular a las siguientes concentraciones 0.002nM, 0.02nM, 0.2nM, 2nM, 20nM.

4.3. MÉTODOS

4.3.1 Cirugía Estereotáxica para inyección de virus adenoasociado

Para la cirugía, los ratones fueron anestesiados en una caja de acrílico conectada a una bomba (RWD isoflurane) con isoflurano al 3% como dosis de inducción y después mantenidos entre 1.5 y 2% dependiendo de los signos vitales y luego posicionados gentilmente en el equipo estereotáxico (KOPF instruments). Para expresar selectivamente los constructos virales en neuronas dopaminérgicas del VTA, se infundió el virus condicional AAV8-Syn-DIO-hM4Di-IRES-mCitrine, bilateralmente en el VTA, utilizando las siguientes coordenadas

estereotáxicas: AP= -3.2 mm; ML=0.5 mm; DV=-4.2mm. Las inyecciones virales se realizaron a través de una pipeta de vidrio desechable, a un flujo de 0.1 μ l/min para completar 1.0 μ l por medio de una bomba neumática (World Precision Instruments, Micro 4™) y se esperaron 10 minutos para retirar la pipeta de inyección. Luego se suturó la herida y administró ketoprofeno (5.0 mg/kg) y suero salino para favorecer su recuperación. Los ratones se recuperaron durante al menos 21 días antes de realizar las inyecciones intraperitoneales de C21 o suero salino.

4.3.2 Medición de actividad locomotora

Luego de la recuperación de la cirugía para inyección del constructo viral se procedió con la medición de la actividad locomotora por activación de hM4Di. Para ello, los animales fueron inyectados diariamente con C21 (3.0mg/kg, i.p.) o con un volumen equivalente de salino. Luego de la inyección, cada ratón fue introducido en una cámara de acrílico blanco de 40 x 40 x 40 cm durante una hora con luz blanca. Desde arriba de la caja se posicionó una cámara y se grabó la actividad locomotora, para ser analizada posteriormente con el programa EthoVision XT (v15.0). Este procedimiento se hizo una vez cada día por 5 días.

4.3.3 Voltametría Cíclica de Barrido Rápido

24 horas después de la última inyección de C21 o salino se procedió con la realización de FSCV. Los animales fueron anestesiados con isoflurano a saturación en una cámara hermética especialmente diseñada para ello, luego de comprobar el estado de anestesia profunda, los animales fueron decapitados y sus cerebros extraídos y posicionados en una cámara que contenía líquido céfalo raquídeo artificial (ACSF) hecho con la siguiente composición: 126.0 mM NaCl, 25.0 mM NaHCO₃, 11.0 mM glucosa, 2.5 mM KCl, 2.4 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 1.2 mM NaH₂PO₄ and 0.4 mM L-ácido ascórbico (ajustado a pH 7.4) frío y continuamente burbujeado con gas carbógeno (O₂/CO₂ 95%/5%; pH 7.4; Linde Gas Chile S.A) y KREB (1259.4 nM NaCl; 24.95 nM KCL; 12.03 nM NaH₂PO₄; 8.16 nM CaCl₂; 12 nM MgCl₂), e inmediatamente se les cortó la base (porción del cerebelo) y fueron adheridos a la placa móvil del vibratomo (modelo vibroslice VSL; World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) con un pegamento en base a cianoacrilato y continuamente perfundidos con el ACSF frío. Se obtuvieron cortes coronales de 300 μ m de grosor que contenían el NAc, los que se dejaron reposando en ACSF a temperatura ambiente por 45 min.

Para los registros de voltametría, los cortes fueron posicionados en una cámara de registro con ACSF burbujeado, a 32°C y se posicionaron 3 electrodos: el de registro, hecho atravesando un pelo de carbono de 7 μ m de diámetro en un tubo de borosilicato, luego fue cortado a 150 μ m desde el sello y finalmente rellenado con una solución de KCl al 10%, el que fue posicionado aproximadamente a 50-100 μ m al lado de la comisura anterior; un electrodo de estimulación (bipolar, plastics one) el que se posicionó 50-100 μ m alrededor del electrodo de registro; un electrodo de referencia de Ag/AgCl, posicionado en el baño. Los registros y análisis de datos se realizaron por medio del software Demon Voltammetry and Analysis Software (Wake Forest Health Science, Winston-Salem, NC, USA). Para el registro se aplicó continuamente un tren triangular de voltaje de -0.4V a 1.2V y viceversa, a una frecuencia de 10Hz (modelo Chem-Clamp Potentiostat, Dagan Corporation, Minneapolis, MN, USA). La liberación de dopamina fue estimulada por el electrodo de estímulo al que se le aplicó una corriente de 300mA (current stimulus isolator NL800A; Digitimer, Ltd., Hertfordshire, UK) cada 3 min. Se consideraron niveles de dopamina estables cuando estos no variaron más del 10% en su altura. Se obtuvieron 6 datos de niveles de línea base y luego se aplicó al baño concentraciones crecientes (1 orden de magnitud) de QNP (0.002 nM a 20 nM). Para cada concentración se tomaron 10 muestras (30 min).

Para calcular la concentración de dopamina equivalente a la corriente generada por su oxidación los electrodos de registro fueron calibrados previo al experimento con una concentración de dopamina de 1mM, el promedio de sensibilidad de los electrodos fue de: 17,7 nA/ μ M

El análisis de los datos obtenidos se realizó calculando la concentración de dopamina liberada o bien comparando la altura en nA de los peaks obtenidos. La recaptura de dopamina fue calculada analizando la fase descendente del peak por medio del cálculo de Tau, la medida del ancho de la curva producida en los registros de voltametría, al 66% desde el *peak* (punto máximo de liberación).

4.3.4 Perfusión transcardíaca

Para la obtención de tejido cerebral, se realizó una perfusión transcardíaca bajo anestesia con isoflurano. Mediante una aguja 25G insertada en el ventrículo izquierdo, se perfundió inicialmente con PBS 0.1 M (pH 7.4, 4°C) hasta eliminar la sangre circulante, seguido inmediatamente de paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS para fijación tisular. Tras la perfusión, el cerebro fue extraído y posfijado en PFA 4% a 4°C durante 4 horas, luego crioprotegido en sacarosa al 30% en PBS a 4°C por 48 horas. Los tejidos se incluyeron en OCT y se realizaron cortes coronales de 30 µm en criostato a -20°C, abarcando regiones de interés (núcleo accumbens, VTA, SNc, hipocampo, estriado y corteza). Las secciones se almacenaron en PBS con azida sódica 0.1% a 4°C en placas de cultivo de 6 pocillos para su posterior procesamiento histológico.

4.3.5 Inmunofluorescencia Indirecta

Los cortes cerebrales de 30 µm fueron sometidos a tres lavados de 10 min con PBS 1X, seguidos de permeabilización con PBS-Triton X-100 0.3% durante 2 h a temperatura ambiente. Tras tres lavados adicionales con PBS-Triton 0.05%, se bloqueó la unión inespecífica incubando los cortes en solución de PBS-Triton 0.05% con 3% suero de caballo y 1% BSA durante 2 h. Posteriormente, se incubaron overnight a 4°C con agitación suave con los anticuerpos primarios diluidos en PBS-Triton 0.05% con 1% suero y 1% BSA: anti-TH de Guinea-Pig (1:3000, SynapticSystems 213004) y anti-D2R de conejo (1:2000, Merck #AB5084P). Al día siguiente, tras tres lavados con PBS-Triton 0.05%, se incubaron 2 h a temperatura ambiente (protegidos de luz) con los anticuerpos secundarios correspondientes: Para el Anti-TH se usó Anti-GP 488 (verde) y para el Anti-D2R se usó Anti-Rb 594 (rojo)

Finalmente, tras tres lavados con PBS, los cortes se montaron en portaobjetos Superfrost Plus™ con medio antifade con DAPI (Abcam #ab104139) y se analizaron mediante microscopía confocal (Zeiss LSM 900) usando láseres de 405 nm (DAPI), 488 nm (Alexa 488) y 561 nm (Cy3), con objetivos 20x/0.8 y 63x/1.4 Oil, incluyendo controles de omisión de primario y autofluorescencia para validar la especificidad de la señal.

5.- RESULTADOS

5.1 VIRUS ADENOASOCIADO FUE EXPRESADO EN NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DEL VTA

Para saber si efectivamente el virus utilizado logró infectar y por tanto hM4Di pudo haber sido correctamente expresado en neuronas dopaminérgicas del VTA, se realizó inmunofluorescencia contra la proteína mCitrine, proteína reportera coexpresada por el vector que codifica para hM4Di. Luego de la recuperación post cirugía estereotáxica, a los animales se les realizó una perfusión transcardíaca, para poder obtener los cortes fijados en paraformaldehído. Para la detección de mCitrine se utilizó un anticuerpo primario anti GFP, que reconoce también a la proteína de interés. A través de inmunofluorescencia se pudo determinar que un grupo de neuronas dopaminérgicas (TH+) del VTA poseen reactividad para mCitrine, lo que indica que el virus efectivamente infectó estas neuronas sugiriendo expresión de hM4Di en las neuronas indicadas (Figura 3).

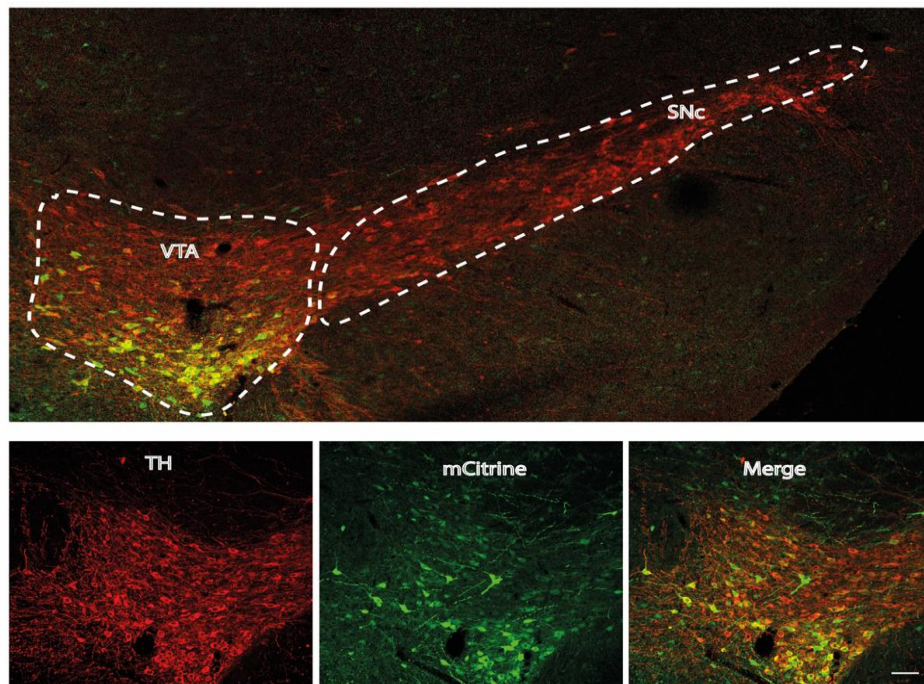


Figura 3. Neuronas dopaminérgicas del VTA fueron infectadas con el virus AAV-hSyn-DIO-HA-hM4Di-IRES-mCitrine. Inmunofluorescencia realizada en un corte coronal que contiene VTA y SNc el cual fue teñido con anticuerpo primario contra TH, marcador de neuronas dopaminérgicas y coincubado con anticuerpo primario anti GFP para la detección de mCitrine, proteína que indica expresión del vector para expresión de hM4Di. Abajo a la izquierda (rojo), se ven células con tirosina hidroxilasa (TH). Al centro abajo (verde) se muestra la marca de mCitrine. Abajo a la derecha en merge, se pueden ver colocalizadas las células TH junto con las proteínas mCitrine, indicando que el virus adenoasociado con hM4Di fue expresado en neuronas dopaminérgicas.

5.2 LA INHIBICIÓN CRÓNICA DE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DEL VTA A TRAVÉS DE QUIMIOTRÓFICA NO MODIFICÓ LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA.

Se analizó la actividad locomotora de los ratones en términos de distancia recorrida, como una forma de evaluar la funcionalidad conductual de la expresión de hM4Di en las neuronas dopaminérgicas del VTA. Luego de al menos 21 días postcirugía, los animales fueron sometidos a inyecciones repetidas de manera intraperitoneal con C21 (agonista hM4Di), luego de cada inyección se posicionó al ratón en un cubo de acrílico blanco (40 x 40 x 40 cms) durante una hora bajo luz blanca y se videograbó la actividad locomotora por medio del programa ethovision.

Este procedimiento se realizó durante 5 días seguidos. Como se muestra abajo (Figura 4), el análisis ANOVA de dos colas no muestra cambios en la actividad locomotora posterior a la inyección aguda ni el tratamiento por 5 días con C21 en los ratones que contienen hM4Di (en verde) en comparación por aquella presentada por los animales controles, que contienen hM4Di, pero fueron inyectados con salino o aquellos sin inyección tratados con C21 o salino. Lo que sugiere que, como se ha reportado anteriormente (Battivelli et al., 2024), la inhibición quimiogénica de la vía dopaminérgica mesolímbica no es suficiente para inducir una disminución en la actividad locomotora.

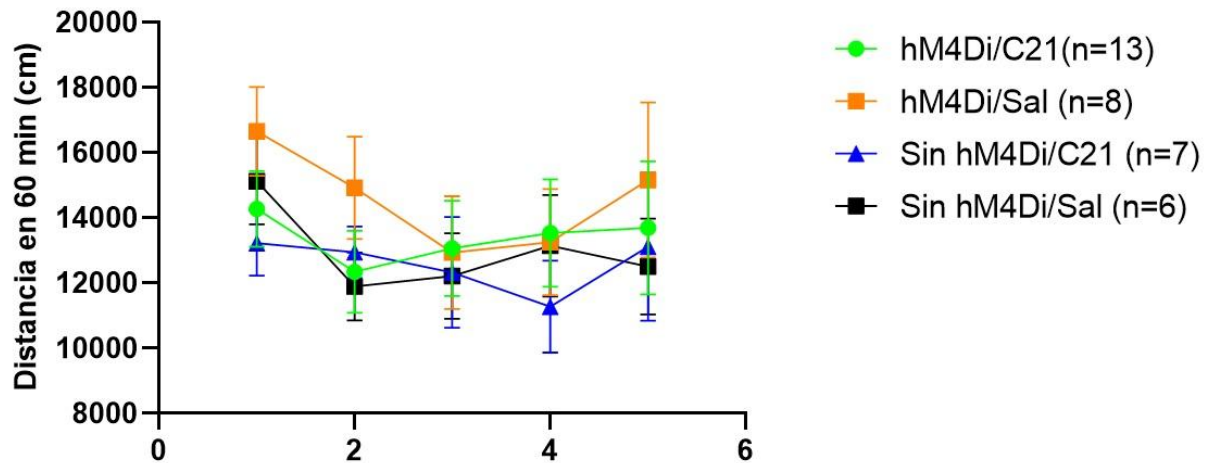


Figura 4. Actividad locomotora luego de la administración diaria por 5 días de C21 o salino a ratones TH Cre que expresan hM4Di o no. Ratones con hM4Di y C21 (hM4D/C21, n= 13), con hM4Di y solución salina (hM4Di/Sal, n=8), sin hM4Di y con C21 (n=7), sin hM4Di y tratados con solución salina (n=6). Después de 21 días de la cirugía estereotáxica, cada ratón fue inyectado de forma intraperitoneal con C21 o solución salina una vez al día por 5 días. Los datos se presentan como media \pm SEM. Se muestra la distancia total recorrida durante la hora de registro en una caja acrílico blanco (40 x 40 x 40) durante 60 minutos mientras se media su desplazamiento con el programa Ethovision xt 7.0 (Noldus, Leesburg, VA, Estados Unidos). Tras realizar un ANOVA de dos vías, no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre grupos.

5.3 LA LIBERACIÓN FÁSICA BASAL DE DOPAMINA TIENE MAYOR VARIANZA EN RATONES CON INHIBICIÓN QUIMIOMÉTRICA CRÓNICA

Con el fin de evaluar si la liberación fásica basal de dopamina en el NAc cambia luego de la inhibición crónica de la vía dopaminérgica mesolímbica, los ratones fueron eutanasiados, los cerebros extraídos y cortados coronalmente para obtener cortes que contienen el NAc. Estos cortes fueron sometidos a voltametría cíclica de barrido rápido donde se posicionaron un electrodo de registro, uno de estímulo y uno de referencia (Figura 5).

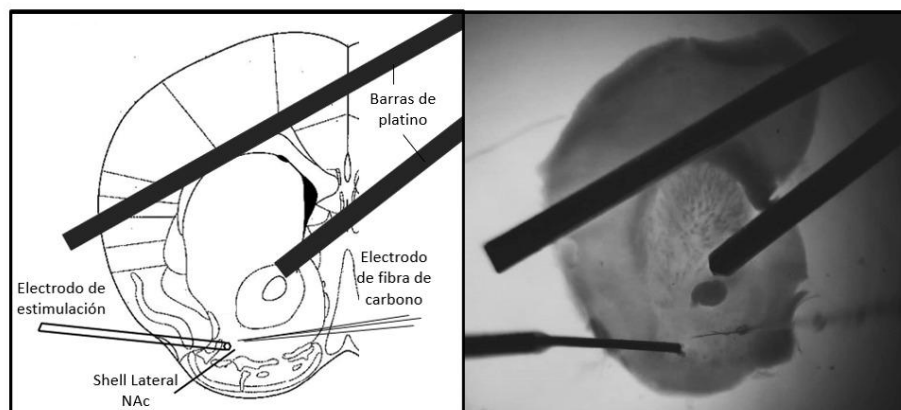


Figura 5. Esquema topográfico de la posición de los electrodos. Corte representativo que contiene el NAc (Bregma \pm 1.21 mm) donde fue realizada la FSCV. Los rectángulos negros son pesos de plata para inmovilizar el corte. El rectángulo blanco es el electrodo de estímulo. Justo a su derecha, a unas 200 micras, se encuentra el electrodo de registro.

Luego de obtener una liberación estable de dopamina se procedió a evocar eléctricamente la liberación de dopamina basal. A continuación (Figura 6) se muestran las corrientes en nano amperios (nA) producidas por la estimulación, hechas a partir de un promedio de 4 estimulaciones, con las cuales se estableció una liberación basal previa a la aplicación de QNP. Los resultados muestran que la corriente promedio generada por la oxidación de dopamina es similar entre grupos experimentales, aunque se ve una tendencia a una mayor varianza en el grupo que posee inhibición quimiogénica crónica (hM4Di).

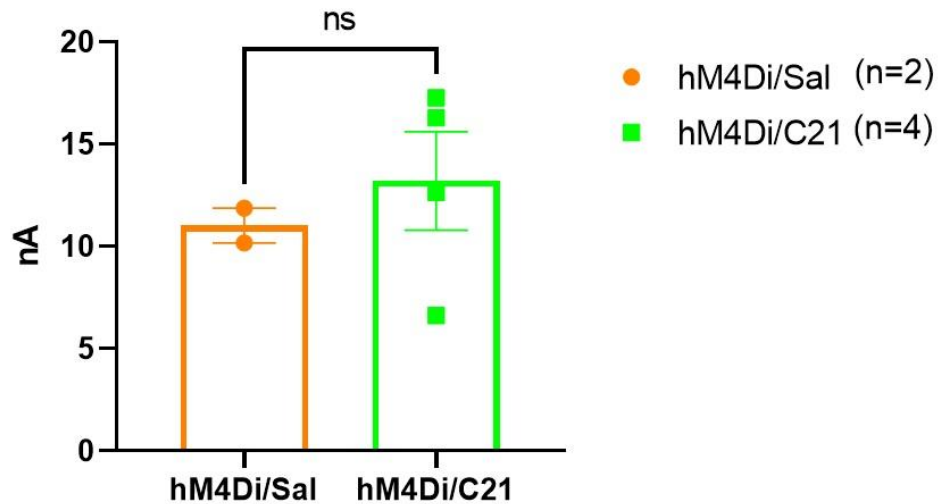


Figura 6. Liberación de dopamina basal en nano amperes. Comparación entre ratones con inhibición crónica (hM4Di/C21) y controles (hM4Di/Sal). Los datos de cada ratón son promedios de las últimas 4 estimulaciones, las cuales no varían más de un 10% entre cada una de ellas. No se puede hacer estadística entre los grupos por falta de muestras, pero una comparación por pares permite establecer diferencias no significativas.

A continuación (Figura 7) se muestran los datos de liberación fásica basal luego de la calibración de los electrodos de registro mostrando que la concentración extracelular de dopamina evocada eléctricamente es similar entre los grupos con inhibición quimiogénica y los controles. Aunque no es posible realizar un análisis estadístico por falta de datos, tal vez haya una tendencia a una mayor variabilidad de los datos en los ratones experimentales.

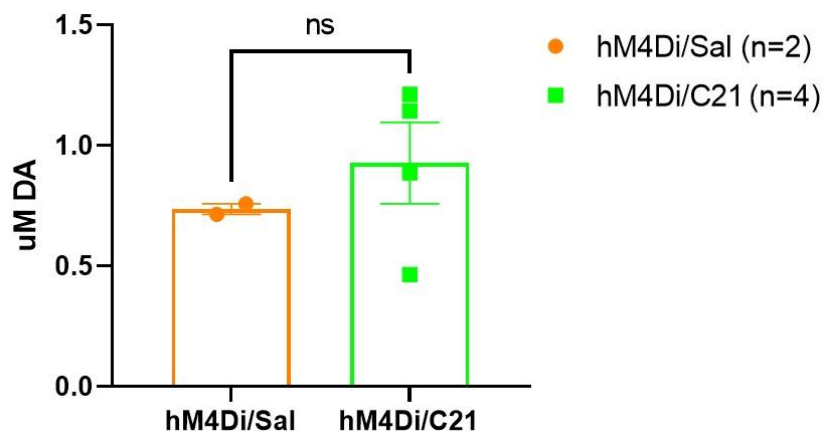


Figura 7. Liberación de dopamina basal normalizada por concentración. El gráfico muestra la concentración de dopamina liberada en promedio por cada ratón. Aunque no se pudo realizar un análisis estadístico, se puede observar una tendencia a una mayor dispersión de los datos en ratones experimentales (hM4Di/C21).

5.4 EL TIEMPO DE RECAPTURA DE DOPAMINA TIENDE A SER MAYOR EN RATONES INHIBIDOS CRÓNICAMENTE

Para evaluar si la inhibición quimiogénica de la vía dopaminérgica mesolímbica impacta sobre la recaptura de dopamina, se evaluó la fase descendente del peak de dopamina obtenido por la estimulación eléctrica (figuras 8.2 y 8.3). Este resultado se analizó considerando un promedio de liberaciones basales (sin QNP) ya estabilizadas. Para evaluar este parámetro analizamos la fase descendente en el modo “peak and decay” en el software Demon Voltammetry. En este modo, el parámetro Tau, es decir el ancho del peak cuando este cae un 66,6%, es equivalente al parámetro Km (afinidad aparente), medida de la afinidad de DAT (Yorgason et al., 2011), que es el mayor contribuyente a producir la remoción de dopamina desde el espacio extracelular. A continuación (Figura 8.1) se compara el Tau promedio (en segundos) obtenido del grupo experimental (hM4Di/C21) y el control con inyección estereotáxica (hM4Di/Sal). Una comparación por pares indica una tendencia a que no existen diferencias en el tiempo que permanece la dopamina en el espacio extracelular, por lo que la inhibición quimiogénica no impactaría en la recaptura de dopamina, lo que es consecuente con no encontrar cambios en los niveles de liberación fásica basal.

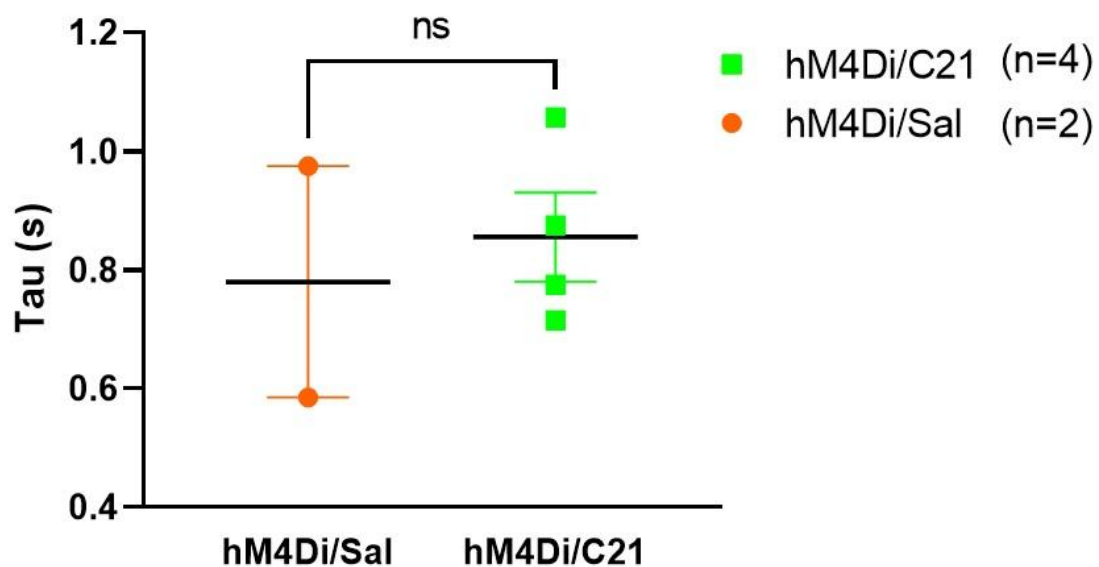
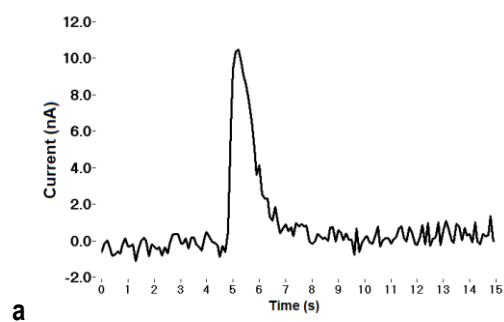
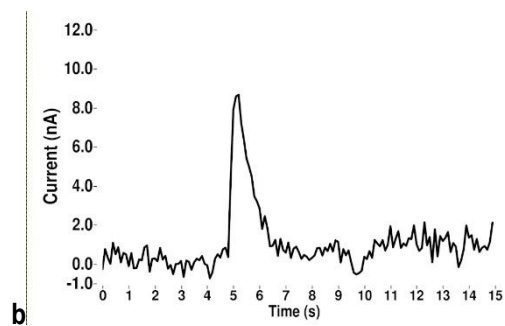


Figura 8.1 Recaptura de dopamina expresada como Tau. Se midió el parámetro Tau entre el grupo experimental (hM4Di/C21; n=4) y el control con inyección estereotáxica (hM4Di/Sal; n=2), el cual indica cuánto tiempo (s) demora la dopamina en ser removida del espacio sináptico. Una comparación por pares muestra que no hay diferencias significativas entre ambos grupos, lo cual podría significar que no existe una diferencia en la recaptura de dopamina por parte de DAT en los ratones con inhibición crónica de dopamina.

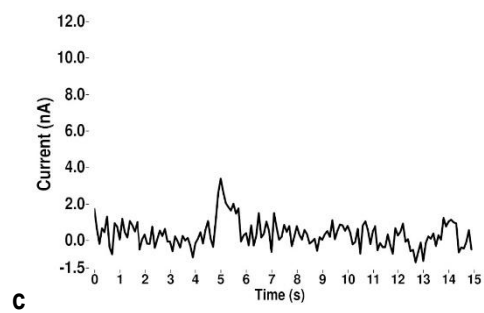
Baseline



0.002nM



0.02nM



0.2nM

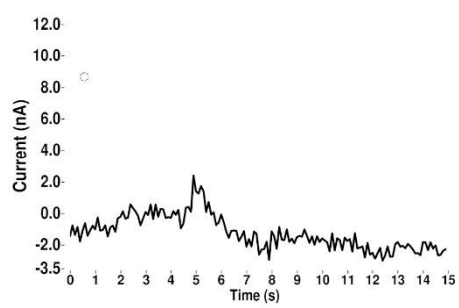


Figura 8.2. Gráficos de corriente versus tiempo con concentraciones crecientes de QNP en ratones con hM4Di/Sal. En a) se observa la corriente (nA) en la condición basal, en b) a 0.002 nM, en c) a 0.02 nM, en d) a 0.2 nM.

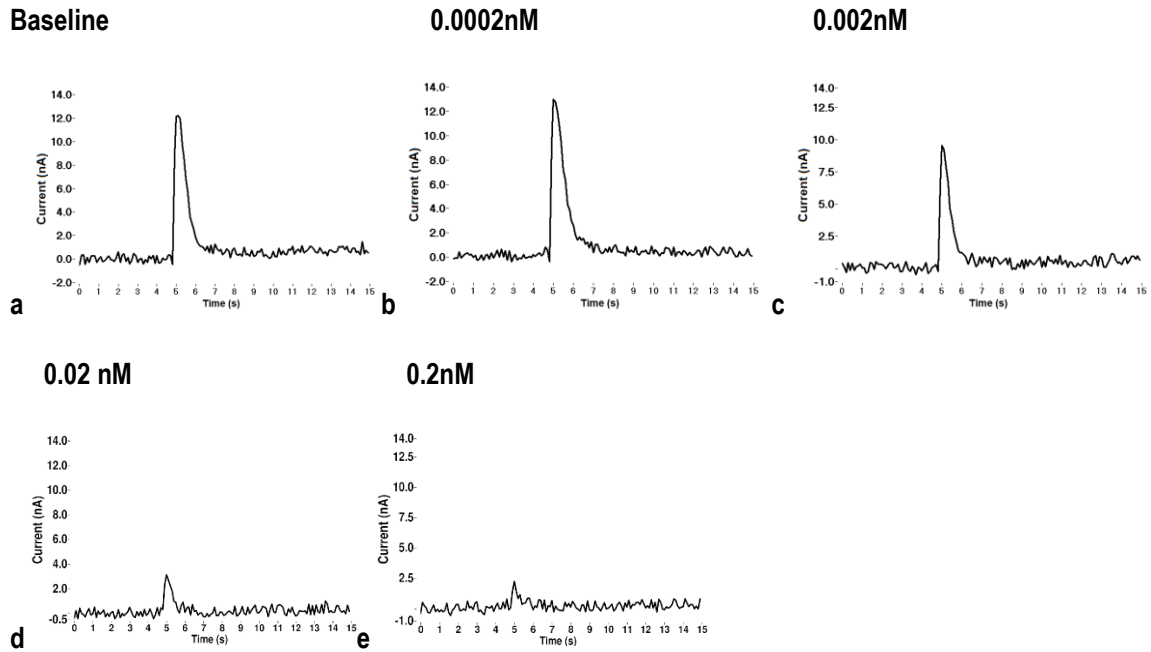


Figura 8.3. Gráficos de corriente versus tiempo con concentraciones crecientes de QNP en ratones con hM4Di/C21. En a) se observa la corriente (nA) en la condición basal, en b) a 0.0002 nM, en c) a 0.002 nM, en d) a 0.02 nM, en e) a 0.2nM

5.5 LA INHIBICIÓN CRÓNICA DE LA VÍA DOPAMINÉRGICA MESOLÍMBICA POR QUIMIOGENÉTICA TIENDE A PRODUCIR AUMENTO DEL EFECTO INHIBITORIO DE QNP SOBRE LA LIBERACIÓN DE DOPAMINA EN EL NAc.

Una de las preguntas de esta tesis es si es que la inhibición crónica de la liberación de dopamina inducida por el tratamiento crónico por C21 modifica la sensibilidad del autoreceptor D_2 ubicado en los terminales dopaminérgicos. Para contestar esta pregunta, una vez obtenidos los registros de liberación de dopamina basal, los cortes fueron incubados con concentraciones crecientes de QNP, encontrándose una tendencia al aumento del efecto inhibitorio del QNP sobre la liberación de dopamina en el NAc (figura 9).

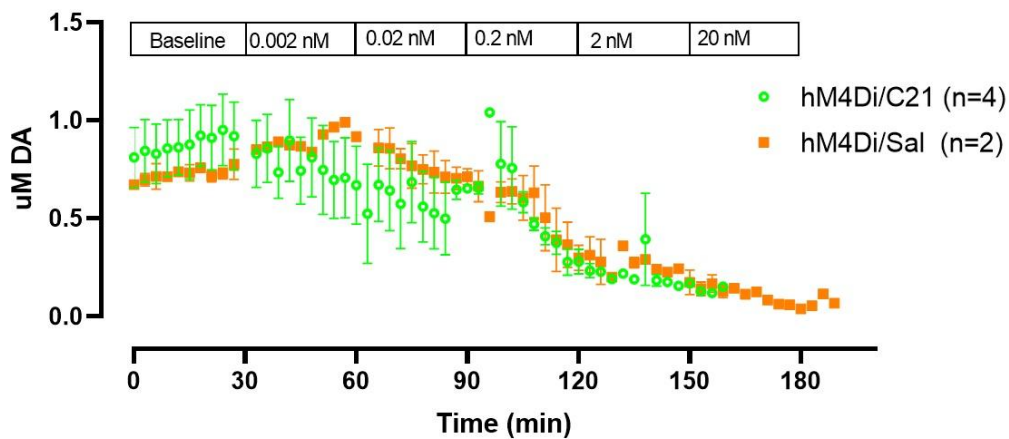


Figura 9. Curso temporal del efecto de concentraciones crecientes de QNP sobre la concentración extracelular de dopamina en el NAc. Los resultados son promedios (SEM) del grupo experimental hM4Di/C21 y el control hM4Di/Sal. Aunque no se puede realizar estadística significativa, los resultados indican que hay una tendencia a que la inhibición crónica en neuronas dopaminérgicas produce sensibilidad al QNP.

5.6 CONCENTRACIONES BAJAS DE QNP PRODUCEN EFECTOS CONTRARIOS ENTRE RATONES CON INHIBICIÓN CRÓNICA Y CONTROLES

Arriba (Figura 9) se muestra el efecto de QNP sobre las concentraciones de dopamina extracelular evocadas eléctricamente en los cortes de NAc y abajo (Figura 10) el efecto sobre la liberación basal, de ratones con inhibición quimiogénica (hM4Di/C21) y controles (hM4Di/Sal).

Se puede observar que los efectos más interesantes ocurren en las concentraciones más bajas de QNP. Por un lado, los ratones controles parecen aumentar la concentración extracelular de dopamina (60 min), mientras que los ratones experimentales la disminuyen (60 min). Si bien no es posible realizar análisis estadísticos y asumiendo que no hubo errores experimentales, los datos sugieren que QNP a dosis muy bajas induce un efecto estimulador sobre la liberación en los controles y un efecto inhibitorio en los animales con inhibición crónica quimiogénica de las neuronas dopaminérgicas mesolímbicas. Lo que implicaría un efecto sensibilizador sobre la función del autorreceptor D₂ provocada por la disminución de la actividad dopaminérgica.

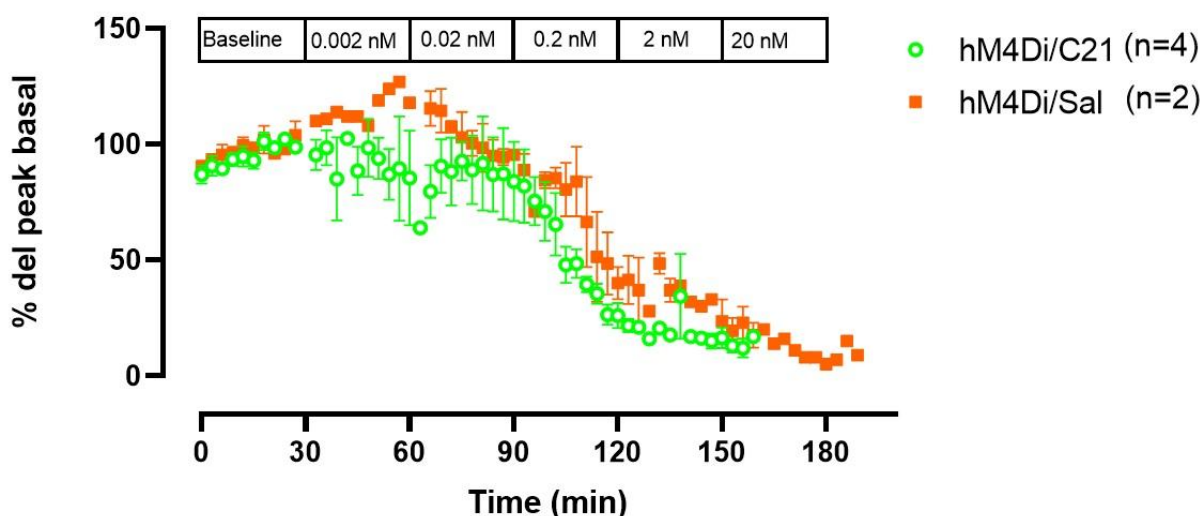


Figura 10. Porcentaje de liberación de dopamina entre ambos grupos. Se estableció una línea de base que fue el promedio de las últimas 4 liberaciones (sin QNP) y luego se calculó un porcentaje de liberación a partir de cada concentración de QNP. Aunque no se pueden establecer diferencias significativas por falta de datos, tal vez hay una tendencia a que en la concentración menor de QNP (0.002 nM), los ratones experimentales (hM4Di/C21) muestren sensibilidad mayor al QNP que los controles (hM4Di/Sal).

Para cuantificar mejor el efecto de QNP a las concentraciones bajas, los datos de los animales experimentales y controles fueron graficados de acuerdo a la magnitud del efecto de QNP (Figura 11). Para ello, se esperó a que se estabilizara la liberación de dopamina en los cortes recién extraídos de cada ratón y se obtuvo un número promedio de los *peaks* de 4 estimulaciones (b). A este promedio se le restó el promedio de las 3 últimas estimulaciones (q) por cada concentración de QNP (x). Luego se usó ese número como divisor del promedio de liberación basal y ese número fue establecido como porcentaje del efecto (b/x)

$$b = \frac{p1 + p2 + p3 + p4}{4}$$

$$x = b - \frac{q1 + q2 + q3}{3}$$

$$\frac{b}{x} = \% \text{ de efecto} * 100$$

Interesantemente se observa que a concentraciones de QNP [20nM], el grupo hM4Di/C21 no presenta datos (Figura 11), es decir, la inhibición producida por esa concentración de QNP en los ratones experimentales es prácticamente total (100%). Además, se aprecia que en la concentración más baja de QNP, los ratones controles presentan una desinhibición en lugar de una inhibición tal y como se mencionó anteriormente (numeral)

Por último, al analizar los pares de columnas [0.02 nM] y [0.2 nM] (rectángulo negro, Figura 11), es posible observar una tendencia a una mayor inhibición de liberación de dopamina en el grupo experimental, lo cual coincide con nuestra hipótesis de que la inhibición crónica de neuronas dopaminérgicas en el VTA causaría la sensibilización de los receptores D₂, provocando así una mayor inhibición por parte de QNP, desapareciendo esta diferencia en las concentraciones más altas de QNP.

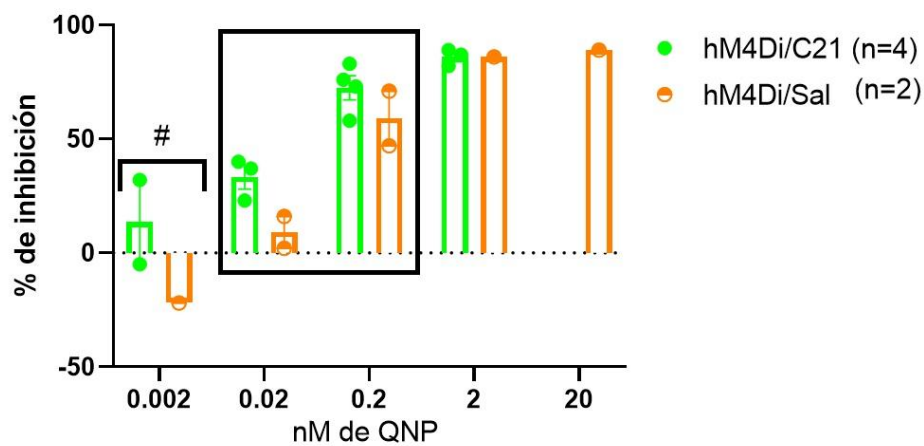


Figura 11. Magnitud del efecto de concentraciones crecientes de QNP. Los porcentajes son el cociente entre un promedio de 4 liberaciones basales (sin QNP) y un promedio de liberación para cada concentración (divisor). Los grupos son con inhibición crónica (hM4Di/C21) y un grupo control (hM4Di/Sal).

6.- DISCUSIÓN

6.1 EFECTOS DE LA INHIBICIÓN REPETIDA DE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS MESOLÍMBICAS SOBRE LA LOCOMOCIÓN

En esta tesis evaluamos el efecto de la inhibición crónica de las neuronas dopaminérgicas por quimiogenética sobre la actividad locomotora, encontrando que la inhibición por 5 días no produce cambios en la locomoción. Como proponen Chohan (et al., 2024), para experimentos con quimiogenética crónica, es importante considerar las compensaciones homeostáticas del organismo, dado que, tanto la experimentación en adultos (Chohan et al., 2023) como en adolescentes (Chohan et al., 2024), produjeron cambios en las liberaciones basales e inducidas por anfetaminas, en ratones tratados crónicamente con quimiogenética. Aunque los citados estudios fueron hechos haciendo lo contrario a lo que se hizo en esta tesis (excitación en lugar de inhibición), no es descartable una adaptación homeostática en nuestros experimentos.

En este sentido, nuestros resultados, al inhibir crónicamente neuronas dopaminérgicas del VTA son consistentes con los de Battivelli (et al., 2024), quienes tampoco encontraron una disminución de actividad locomotora al inhibir neuronas dopaminérgicas del VTA. La única diferencia es que ellos utilizaron CNO (n-óxido de clozapina, forma inerte del fármaco) en vez de C21, lo cual podría tener alguna diferencia dado que, en ratones, el CNO se metaboliza en clozapina a nivel hepático (Ferrari et al., 2022), pero como se dijo, no hubo diferencias. Por el contrario, Chohan (et al., 2024) quienes activaron neuronas dopaminérgicas del VTA, sí encontraron un aumento de la locomoción, pero solo en la primera dosis (que funciona como dosis aguda), para luego compensar homeostáticamente y reducir la locomoción. Queda por descubrir qué es lo que hace que nuestros resultados y los de Chohan no sean exactamente antagónicos. Además, debemos considerar que resultados del laboratorio de electrofisiología, aun no publicados (figura suplementaria 1) muestran que incluso luego de los 5 días de activación de hM4Di con C21, la aplicación aguda de CNO en cortes de VTA induce inhibición sobre la actividad espontánea y evocada de las neuronas dopaminérgicas que los contienen, indicando que luego de este periodo hM4Di sigue siendo funcional y por tanto debería inhibir la actividad de las neuronas dopaminérgicas mesolímbicas cuando es activado.

Ahora bien, el estudio de las funciones de los receptores D_2/D_3 y su efecto en la locomoción es más complejo que, por ejemplo, el estudio de los receptores D_1 que se expresan sólo de manera post sináptica, porque el origen de las funciones de los D_2 son resultado de sus expresiones tanto pre como post sinápticas (Missale et al., 1998; Sibley, 1999; Beaulieu, 2011). Esta tesis considera este hecho a través del protocolo quimiogenético, por medio del cual se buscó aislar la función de los autorreceptores de neuronas dopaminérgicas que se proyectan desde el VTA hacia el estriado ventral (NAc). Respecto al hecho de que existen diferencias de activación entre los receptores pre y postsinápticos para las distintas dosis de un mismo agonista, en esta tesis hemos hecho un perfil dosis/respuesta al QNP en el momento de la voltametría, con lo cual pudimos observar diferencias en la liberación fásica de dopamina, las cuales asumimos que deben tener relación con los efectos de la activación a distintas dosis de agonista de los autorreceptores D_2 . En este sentido, es pertinente tener en consideración que los autorreceptores (la versión splicing corta D_2s , es decir, pre sinápticos) podrían ser más afines a dopamina que los D_2 postsinápticos (la versión D_2L), y que, por lo tanto, esto pudo tener implicancias en los resultados de liberación cuando se utilizan las concentraciones más bajas QNP en la voltametría.

6.2 EFECTOS DE LA INHIBICIÓN QUIMIOGÉNICA CRÓNICA DE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS MESOLÍMBICAS SOBRE LA LIBERACIÓN Y RECAPTACIÓN (REMOCIÓN) DE DOPAMINA.

6.2.1 TAU y su relación con los transportadores de dopamina (DAT)

Los factores que influyen en el aclaramiento extracelular de dopamina interactúan simultáneamente (o bien, en muchos casos, en un rango temporal muy mínimo) para dar como resultado su efecto específico. Para esta tesis, sólo se analizó el aclaramiento de dopamina por medio de un indicador extraído en la voltametría llamado TAU que es una constante cinética del transportador. Una cuestión relevante para esta tesis respecto de los DAT, es que producto de su naturaleza dependiente de sodio y cloro, 2 iones Na^+ y 1 de Cl^- mueven una molécula de dopamina (Krueger et al., 1990) los DAT juegan un rol, no solo en la remoción de dopamina desde el espacio extracelular, sino también en la modulación de la liberación de dopamina, dado que este movimiento de iones tiene efectos electrofisiológicos en la célula. Como indican Mortensen & Amara (2003), las propiedades biofísicas de los DAT implican conductancias aniónicas. Según el grupo de Ingram (et al., 2002), esta conductancia es activa a niveles de dopamina más bajos que los necesarios para la activación D_2 y promueve la excitabilidad de las neuronas (Mortensen & Amara, 2003), los cuales impactan en los potenciales de membrana, pudiendo alterar finalmente la liberación de dopamina. Como los DAT pueden ser endocitados (Vaughan & Foster, 2013) por estimulación de clatrina y dinamina mediada por fosforilación dependiente de proteína quinasa C (Lider & Melikian, 2003) y que la regulación de la endocitosis puede ser aguda o de largo plazo mediada por degradación lisosomal (Hong & Amara, 2013), además de que la cinética de los transportes mismos, es decir, su velocidad para transportar sustratos podría ser alterada independiente de la endocitosis de estos (Moritz et al., 2015). Todos estos factores escapan a nuestra metodología y, por tanto, a los medios para analizarlos (Moritz et al., 2015). Sin embargo, el indicador canónico del funcionamiento de DAT es TAU. Aunque nuestros datos no muestran diferencias significativas en TAU, los ratones con inhibición crónica parecieran mostrar una leve tendencia a aumentarlo, lo que implicaría una menor función de DAT, visto así y considerando que DAT no solamente afectará la remoción, sino que también podría afectar la liberación por efectos electroquímicos ¿podría ser que, al disminuir crónicamente la dopamina, se produjera un cambio en el potencial de membrana de las células dopaminérgicas que tuviera como consecuencia un menor grado de funcionamiento de los DAT? Aunque se debe tomar precaución con esta idea porque las neuronas regulan de manera muy precisa los potenciales de membrana. Como proponen Benoit-Marand (et al., 2011) podría ser que la aceleración de la recaptación mediada por auto receptores ocurriera solo durante períodos de excesiva activación de los D_2 o por prolongados trenes de estimulación. Por otro lado, la activación de D_2 incrementa tanto la expresión como la actividad de DAT a través de la activación de la vía ERK1/2 (Mayfield & Zahniser, 2001; Lee et al., 2007) por lo que es posible preguntarse si los cambios de sensibilidad de los receptores D_2 que se sugieren de los resultados de esta tesis son o no proporcionales al cambio en la actividad de DAT. Por otro lado, Sahlholm et al., (2008) encontraron que los receptores D_{2s} mostraban sensibilidad a voltaje, lo cual también va en línea con la idea de que cambios en los transportadores de dopamina puedan impactar en el funcionamiento de los receptores D_2 . El problema, finalmente, sería saber cuál influencia al otro primero o si tienen una interacción simultánea. Una última posibilidad para explicar el aumento de liberación por pequeñas dosis de QNP en ratones controles, podría estar relacionada con que, además de todo lo dicho sobre DAT, también se sabe que estos producen liberación en determinadas circunstancias no solo farmacológicas (i.e como sería el caso de las anfetaminas). Por ejemplo, según Blakely (2001), a partir de los experimentos de Falkenburger et al., (2001), se demuestra que el eflujo de dopamina a través de DAT es posible bajo circunstancias fisiológicas como la estimulación de alta frecuencia de las entradas a la sustancia nigra, lo que en esta tesis no es posible de evidenciar puesto que los experimentos de voltametría fueron realizados en cortes que contienen NAc, por lo que no contienen los somas de las neuronas dopaminérgicas.

6.2.2 Porcentaje de inhibición

Usualmente, se esperaría que el QNP tuviera un efecto inhibitor desde el inicio de los baños en el *slice*, no obstante, hemos visto lo contrario. Desde lo más simple, podríamos suponer que la concentración más baja de QNP, ni siquiera alcanzaría a activar los receptores D₂ en ratones control, pero entonces ¿por qué sí activaría receptores D₂ en los ratones inhibidos crónicamente (experimentales)? Una posible razón, sería que efectivamente los receptores D₂ aumentaron su sensibilidad al estar expuestos a menor concentraciones de dopamina (por la inhibición crónica), lo cual estaría en línea con nuestra hipótesis de trabajo. El problema seguiría siendo explicar por qué en los ratones controles se observa una desinhibición, lo que conceptualmente se puede explicar como un agonista inverso. Es decir, ¿podría ser que el QNP funcione como agonista inverso en una concentración demasiado baja? Para responder a esto, se tendría que hacer una comparación exponiendo los receptores a sulpirida u otro agonista inverso conocido, para ver diferencias entre estos y QNP. Además, recordando la idea de que una concentración menor de dopamina necesaria para activar a receptores D₂ (Ingram et al., 2002), afectaría el funcionamiento de los DAT ¿podría este hecho estar relacionado con el efecto contrario al esperado en concentraciones menores de QNP en los ratones controles? Es decir, ¿puede QNP servir como sustrato de DAT y de esta forma alterar algunas de las funciones de este (como captador de dopamina o alterador de la electrofisiología de la célula)? Este efecto de agonista sintético de dopamina como sustrato de otros transportadores (e.j bromocriptina y OATP1A2, un transportador orgánico aniónico) se ha visto (Schäfer et al., 2020), pero no hemos encontrado estudios para QNP como sustrato de DAT.

6.2.3 Liberación basal (sin QNP)

En este trabajo no se encontraron diferencias significativas respecto de la liberación fásica basal de dopamina en el NAc (previa al QNP), aunque si una tendencia pequeña a un aumento de la liberación en los ratones con inhibición crónica quimiogénica, lo que significaría que la inhibición crónica o la exposición a bajos niveles de dopamina, altera de formas asimétricas (o desiguales) la fisiología de la neurona, produciendo mayor dispersión de los datos si los comparamos con los ratones controles, cuyos niveles de dopamina se mantuvieron en niveles fisiológicos. Otra tendencia aparente, es que hubo mayor liberación basal en los ratones experimentales. Nuevamente, si este resultado fuera real, quizás se podría interpretar como un “rebote” en la liberación de dopamina, es decir, que al haber estado inhibiéndose constantemente a las neuronas dopaminérgicas, éstas hubieran quedado más propensas a liberar dopamina. El siguiente paso sería descubrir si esto ocurre por un cambio en las afinidades de cada receptor o por un cambio en la expresión (cantidad) de receptores en la membrana, Interesantemente, frente a concentraciones más grandes de QNP el efecto inhibitorio es muy parecido entre ambos grupos lo que sugiere que con esas concentraciones existe una ocupación completa de los receptores D₂ en los terminales dopaminérgicos.

7.- CONCLUSIONES

En esta tesis logramos expresar por medio de inyección viral por cirugía estereotáxica el virus que contiene DREADD inhibitorio hM4Di en neuronas dopaminérgicas del VTA. Encontramos que la inyección del agonista DREADD (C21) por 5 días no produjo cambios en la actividad locomotora de los animales, sugiriendo que la inhibición crónica de esta vía no es suficiente para disminuir la locomoción (ver limitaciones del estudio). Por otro lado, la evaluación funcional por el registro de célula única que expresaba hM4Di mostró que este receptor (DREADD) sigue siendo funcional luego de la inhibición crónica, lo que sugiere que la administración de C21 inhibió las neuronas dopaminérgicas luego de cada inyección. Además, logramos realizar voltametría cíclica de barrido rápido en cortes coronales que contienen el NAc. Si bien el número de animales registrados no fue el suficiente para realizar análisis estadísticos nuestros resultados sugieren tendencias hacia un aumento de la liberación fásica basal, una disminución de la recaptura (debido a un aumento del parámetro TAU) y un aumento

en el efecto inhibitorio del receptor D_2 presináptico, lo que se refleja en una mayor acción de QNP en dosis pequeñas, sugiriendo que la inhibición crónica de la liberación de dopamina impacta en la sensibilidad del receptor D_2 , lo que podría subyacer al efecto sensibilizador de QNP en otros modelos animales. Si es que esta mayor sensibilización es producto de una mayor expresión de receptores D_2 en la membrana o si es producto de un aumento en la afinidad de cada receptor queda por ser dilucidado.

Existe un efecto bifásico en la liberación de dopamina entre las dosis más bajas y más altas de agonista D_2 . Es decir, a menores dosis, la liberación aumenta en los ratones controles, para luego seguir el mismo curso que los ratones experimentales.

8.- LIMITACIONES Y PROYECCIONES FUTURAS

Aunque en cada experimento se buscó homogeneidad en la posición de los electrodos y dada la heterogeneidad de proyecciones axonales desde las neuronas dopaminérgicas del VTA, sumado a la dificultad en el desarrollo óptimo de la técnica de voltametría, no podemos asegurar que este estudio tiene la especificidad y consistencia necesaria en la posición de los electrodos de registro en el NAc con el fin de lograr condiciones lo más replicables posibles. Como se ha visto (Lammel et al., 2008; Beier et al., 2015) la porción lateral del VTA tiene proyecciones no sobrepuestas hacia distintos lugares del NAc, lo cual sugiere funciones únicas entre distintas subpoblaciones de neuronas dopaminérgicas del VTA.

Debido a la naturaleza del trabajo respecto de las condiciones de variabilidad en el aprendizaje y en la oportunidad y éxito en la realización de cada experimento, la muestra total es baja, por lo que no se pudo realizar estadística significativa.

No se pudo cotejar en cada experimento el número de neuronas del VTA infectadas con DREADDs. Con este dato se hubiera podido descartar si la ausencia de disminución de locomoción esperada por inhibición crónica de neuronas dopaminérgicas del VTA tuvo que ver con ese hecho o no. Se sugiere que al momento de realizar las voltametrías, se guarden, o bien, si es posible, se realicen inmediatamente también los registros electrofisiológicos en el VTA para saber si los receptores hm4Di se expresaron y fueron funcionales en cada ratón.

9.- PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS

- Presentación de póster en Congreso SOFARCHI 2023, diciembre, Antofagasta, Chile.
- Parte de los resultados de esta tesis fueron presentados en el póster presentado en el Annual meeting of the Society For Neuroscience, "Neuroscience 2024", Octubre, Chicago, Estados Unidos.
- Presentación de póster en Congreso SOFARCHI 2025, diciembre, Valdivia, Chile.

10.- ANEXOS

Acta de Aprobación Bioética Asociada al Proyecto



ACTA DE CONVALIDACION BIOETICA CBC 108-2024

1. El Comité de Bioética Animal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso, declara haber recibido la documentación necesaria para la aprobación bioética asociada al desarrollo del proyecto de tesis de postgrado del Sr. Juan Solís Rodríguez, investigador responsable del proyecto, y cuya investigadora patrocinante es la Dra. Angélica Escobar Maldonado.
2. El Comité de Bioética revisó todos los antecedentes. En esta evaluación se confirma que en la investigación del Sr. Solís se realizarán los procedimientos experimentales indicados en un proyecto que cuenta con aprobación bioética vigente (acta **CBC 90-2023**), por lo mismo, utilizará animales previamente autorizados en esa misma acta.
3. Por lo anterior, el Comité de Bioética Animal de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Valparaíso, aprueba los procedimientos y la utilización de animales en la investigación del Sr. Solís. **La vigencia de la aprobación bioética es 17/04/2024 hasta 31/12/2024.**
4. De ocurrir cambios experimentales que se encuentren fuera de lo aprobado por el comité institucional, o de necesitar aplazamiento para el desarrollo de la investigación, la investigadora responsable deberá enviar una solicitud de enmienda para la aprobación bioética al comité respectivo.


Gabriela Muñoz Cerda
Vicepresidenta



Comité de Bioética Animal, Facultad de Ciencias
Universidad de Valparaíso

Valparaíso, 17 de abril de 2024.

**ACTA DE EVALUACIÓN BIOÉTICA
CÓDIGO CBC 90-2023**

El Comité de Bioética Animal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso (CBC-UV), con fecha 26 de octubre de 2023 declara haber evaluado el siguiente protocolo experimental:

INVESTIGADOR RESPONSABLE: Angélica Escobar Maldonado.

TÍTULO DEL PROYECTO: Impacto de la modulación de la actividad dopaminérgica en un modelo de conductas compulsivas.

Para su evaluación, el comité revisó los antecedentes presentados en el FORMULARIO DE SOLICITUD DE APROBACIÓN PARA INVESTIGACIÓN EN ANIMALES COMO SUJETOS DE INVESTIGACIÓN valorando criterios bioéticos y de cuidado animal. El comité consideró procedentes los aspectos indicados en el formulario y estima que no hay objeciones para el uso de animales propuesto en este proyecto. Por lo anterior, el Comité de Bioética Animal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso **aprueba** este protocolo experimental con las siguientes condiciones:

Vigencia de la aprobación: desde el 26/10/2023 al 24/01/2025.

Cepa o especie animal: *Mus musculus*, Ratón C57BL6.

Número total de animales: 80

Personas autorizadas en el protocolo: Angélica Escobar Maldonado, Nelson Urrea Jara y Juan Francisco Solís Rodríguez.

La Investigadora Responsable debe asegurar que todas las personas involucradas en el protocolo e individualizadas en esta acta se hayan capacitado en la realización de los procedimientos indicados en éste. Si requiere cambiar cualquier aspecto de este estudio, como objetivos, personal, patrocinadores, procedimientos y número de animales entre otros, deberá enviar una SOLICITUD DE ENMIENDA al correo bioetica.ciencias@uv.cl. Estos cambios no se deben iniciar hasta que el CBC-UV haya aprobado la enmienda.

Una vez terminado el proyecto de investigación, se solicita informar al CBC-UV para proceder al cierre del protocolo. Cabe señalar, que es deber de la Investigadora Responsable, mantener actualizados los registros de procedimientos realizados con animales. Estos serán revisados por el CBC-UV en las actividades de seguimiento del protocolo aprobado. El no cumplimiento de este protocolo puede significar la revocación de esta aprobación bioética e información al Decano/a.



Gabriela Muñoz Cerda
Vicepresidenta
Comité de Bioética, Facultad de Ciencias,
Universidad de Valparaíso

Gran Bretaña 1111 • Playa Ancha • Valparaíso
bioetica.ciencias@uv.cl

11.- FIGURAS SUPLEMENTARIAS

Validación funcional de hM4Di mediante registros electrofisiológicos

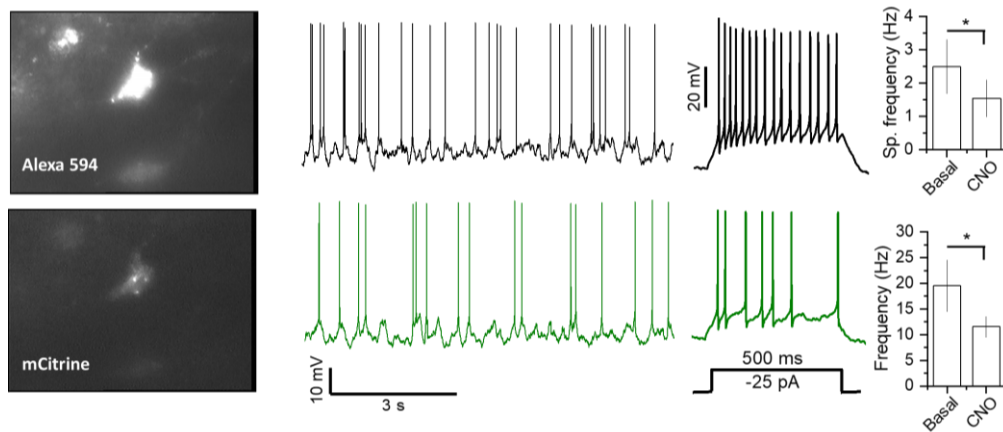


Figura suplementaria 1. Inhibición de neuronas dopaminérgicas hM4Di-positivas por aplicación de CNO. A la izquierda, imágenes de fluorescencia que muestran una neurona dopaminérgica del VTA registrada rellena con Alexa 594 (arriba) e identificada por la expresión de mCitrine (abajo), marcador coexpresado con el receptor DREADD inhibitorio hM4Di. A la derecha, registro de whole-cell patch-clamp configuración current clamp en condiciones basales mostrando presencia de potenciales de acción espontáneos y luego de la inyección de un pulso de corriente por medio de la pipeta de registro (trazos negros). Luego de estos registros se aplicó en el baño CNO, evidenciando una disminución marcada en la frecuencia de potenciales de acción espontáneos como inducidos eléctricamente tras la activación del hM4Di.

12.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Armbruster BN, Li X, Pausch MH, Herlitze S, Roth BL. Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potently activated by an inert ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Mar 20;104(12):5163-8. doi: 10.1073/pnas.0700293104. Epub 2007 Mar 2. PMID: 17360345; PMCID: PMC1829280.
- Arnsten A F T, Cai J X, Steere JC, Goldman-Rakic PS (1995) Dopamine D2 receptor mechanisms contribute to age-related cognitive decline: The effects of quinpirole on memory and motor performance in monkeys. *J Neurosci* 15: 3429-3439
- Arnsten AF. Catecholamine regulation of the prefrontal cortex. *J Psychopharmacol* 1997;11(2):151–62.
- Battivelli D, Vernochet C, Conabady E, Nguyen C, Zayed A, Lebel A, Meirsman AC, Messaoudene S, Fieggen A, Dreux G, Rigoni D, Le Borgne T, Marti F, Contesse T, Barik J, Tassin JP, Faure P, Parnaudeau S, Tronche F. Dopamine Neuron Activity and Stress Signaling as Links Between Social Hierarchy and Psychopathology Vulnerability. *Biol Psychiatry*. 2024 Apr 15;95(8):774-784. doi: 10.1016/j.biopsych.2023.08.029. Epub 2023 Oct 5. PMID: 37804900.
- Beaulieu JM, Gainetdinov RR. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev*. 2011 Mar;63(1):182-217. doi: 10.1124/pr.110.002642. Epub 2011 Feb 8. PMID: 21303898.
- Beckstead MJ, Ford CP, Phillips PE, Williams JT (2007) Presynaptic regulation of dendrodendritic dopamine transmission. *Eur J Neurosci* 26:1479–1488.
- Beier KT, Steinberg EE, DeLoach KE, Xie S, Miyamichi K, Schwarz L, Gao XJ, Kremer EJ, Malenka RC, Luo L. Circuit Architecture of VTA Dopamine Neurons Revealed by Systematic Input-Output Mapping. *Cell*. 2015 Jul 30;162(3):622-34. doi: 10.1016/j.cell.2015.07.015. PMID: 26232228; PMCID: PMC4522312.
- Bello EP, Mateo Y, Gelman DM, Noain D, Shin JH, Low MJ, Alvarez VA, Lovinger DM, Rubinstein M (2011) Cocaine supersensitivity and enhanced motivation for reward in mice lacking dopamine D2 autoreceptors. *Nat Neurosci* 14:1033–1038.
- Benoit-Marand M, Ballion B, Borrelli E, Boraud T, Gonon F (2011) Inhibition of dopamine uptake by D2 antagonists: an in vivo study. *J Neurochem* 116:449–458.
- Benoit-Marand M, Borrelli E, Gonon F (2001) Inhibition of dopamine release via presynaptic D2 receptors: time course and functional characteristics in vivo. *J Neurosci* 21:9134–9141
- Benoit-Marand, M., Jaber, M., Gonon, F., 2000. Release and elimination of dopamine in vivo in mice lacking the dopamine transporter: functional consequences. *Eur. J. Neurosci.* 12 (8), 2985–2992.
- Berke JD What does dopamine mean? *Nature Neuroscience* 21, 787–793 (2018). [PubMed: 29760524]
- Berridge K, Kringelbach M. 2015. Pleasures Systems in the Brain. *Neuron, Volume 86, Issue 3, 646 – 664*
- Blakely RD. Neurobiology. Dopamine's reversal of fortune. *Science*. 2001 Sep 28;293(5539):2407-9. doi: 10.1126/science.1065931. PMID: 11577225.
- Brozoski T, Brown R M, Rosvold H E, Goldman P S (1979) Cognitive deficit caused by regional depletion of dopamine in prefrontal cortex of rhesus monkey. *Science* 205: 929-931
- Bubser M, Schmidt WJ (1990) 6-OHDA lesions of the rat prefrontal cortex increases locomotor activity, impairs acquisition of delayed alternation tasks, but does not affect uninterrupted tasks in the radial maze. *Behav Brain Res* 37:157-168

- Cardozo DL, Bean BP (1995) Voltage-dependent calcium channels in rat midbrain dopamine neurons: modulation by dopamine and GABAB receptors. *J Neurophysiol* 74:1137–1148
- Cass W. A. and Gerhardt G. A. (1994) Direct in vivo evidence that D2 dopamine receptors can modulate dopamine uptake. *Neurosci. Lett.* 176, 259–263.
- Cho, HU., Kim, S., Sim, J. et al. Redefining differential roles of MAO-A in dopamine degradation and MAO-B in tonic GABA synthesis. *Exp Mol Med* **53**, 1148–1158 (2021). <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00646-3>
- Chohan MO, Fein H, Mirro S, O'Reilly KC, Veenstra-VanderWeele J. Repeated chemogenetic activation of dopaminergic neurons induces reversible changes in baseline and amphetamine-induced behaviors. *Psychopharmacology*. 2023;240(12):2545–60.
- Chohan MO, Lewandowski AB, Siegel RN, O'Reilly KC, Veenstra-VanderWeele J. Adolescent chemogenetic activation of dopaminergic neurons leads to reversible decreases in amphetamine-induced stereotypic behavior. *Mol Brain*. 2024 Jun 11;17(1):36. doi: 10.1186/s13041-024-01110-9. PMID: 38858755; PMCID: PMC11165814.
- Cockerham, R.; Liu, S.; Cachope, R.; Kiyokage, E.; Cheer, J. F.; Shipley, M. T.; Puche, A. C. Subsecond Regulation of Synaptically Released Dopamine by COMT in the Olfactory Bulb. *J. Neurosci.* 2016, 36, 7779-7785.
- Congar P, Bergevin A, Trudeau LE (2002) D2 receptors inhibit the secretory process downstream from calcium influx in dopaminergic neurons: implication of K⁺ channels. *J Neurophysiol* 87:1046–1056.
- Cools R, D'Esposito M. Inverted-U-shaped dopamine actions on human working memory and cognitive control. *Biol Psychiatry*. 2011 Jun 15;69(12):e113-25. doi: 10.1016/j.biopsych.2011.03.028. Epub 2011 May 4. PMID: 21531388; PMCID: PMC3111448.
- Dalley JW, Everitt BJ, Robbins TW. 2011. Impulsivity, compulsivity, and top-down cognitive control. *Neuron* 69:680–94
- De Mei C, Ramos M, Iitaka C, Borrelli E. Getting specialized: presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors. *Curr Opin Pharmacol*. 2009 Feb;9(1):53-8. doi: 10.1016/j.coph.2008.12.002. Epub 2009 Jan 8. PMID: 19138563; PMCID: PMC2710814.
- 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. doi: 10.1073/pnas.85.14.5274. PMID: 2899326; PMCID: PMC281732.
- 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. doi: 10.1046/j.1471-4159.1999.0720148.x. PMID: 9886065.
- Dohlman HG (2009) Chapter 1 RGS Proteins The Early Days. *Prog Mol Biol Transl Sci* 86:1–14.
- Dohlman HG and Thorner J (1997) RGS proteins and signaling by heterotrimeric G proteins. *J Biol Chem* 272:3871–3874
- Dreisbach G, Muller J, Goschke T, et al. Dopamine and cognitive control: the influence of spontaneous eyeblink rate and dopamine gene polymorphisms on perseveration and distractibility. *Behav Neurosci* 2005;119(2):483–90.

- El Mestikawy S, Wallén-Mackenzie A, Fortin GM, Descarries L, Trudeau LE. From glutamate co-release to vesicular synergy: vesicular glutamate transporters. *Nat Rev Neurosci*. 2011 Apr;12(4):204-16. doi: 10.1038/nrn2969. Erratum in: *Nat Rev Neurosci*. 2011 Jul;12(7):425. PMID: 21415847.
- Escobar AP, Cornejo FA, Olivares-Costa M, González M, Fuentealba JA, Gysling K, España RA, Andrés ME. Reduced dopamine and glutamate neurotransmission in the nucleus accumbens of quinpirole-sensitized rats hints at inhibitory D2 autoreceptor function. *J Neurochem*. 2015 Sep;134(6):1081-90. doi: 10.1111/jnc.13209. Epub 2015 Jul 14. PMID: 26112331.
- Falkenburger B. H., Barstow K. L., Mintz I. M., Dendrodendritic inhibition through reversal of dopamine transport *Science* 293, 2465 (2001).
- Ferguson SS (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 53:1–24.
- Ferguson SS, Barak LS, Zhang J, and Caron MG (1996) G-protein-coupled receptor regulation: role of G-protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Can J Physiol Pharmacol* 74:1095–1110
- Ferrari LL, Ogbeide-Latario OE, Gompf HS, Anaclet C. Validation of DREADD agonists and administration route in a murine model of sleep enhancement. *J Neurosci Methods*. 2022 Oct 1;380:109679. doi: 10.1016/j.jneumeth.2022.109679. Epub 2022 Jul 30. PMID: 35914577; PMCID: PMC10228294.
- Floresco SB, West AR, Ash B, Moore H & Grace AA Afferent modulation of dopamine neuron firing differentially regulates tonic and phasic dopamine transmission. *Nat. Neurosci* 6, 968–973 (2003). [PubMed: 12897785]
- Ford CP. The role of D2-autoreceptors in regulating dopamine neuron activity and transmission. *Neuroscience*. 2014 Dec 12;282:13-22. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.01.025. Epub 2014 Jan 23. PMID: 24463000; PMCID: PMC4108583.
- Free RB, Hazelwood LA, Cabrera DM, Spalding HN, Namkung Y, Rankin ML, and Sibley DR (2007) D1 and D2 dopamine receptor expression is regulated by direct interaction with the chaperone protein calnexin. *J Biol Chem* 282:21285–21300
- Fulton S, Thibault D, Mendez JA, Lahaie N, Tirota E, Borrelli E, Bouvier M, Tempel BL, Trudeau LE (2011) Contribution of Kv1.2 voltage-gated potassium channel to D2 autoreceptor regulation of axonal dopamine overflow. *J Biol Chem* 286:9360–9372.
- Gainetdinov RR, Premont RT, Bohn LM, Lefkowitz RJ, and Caron MG (2004) Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annu Rev Neurosci* 27:107–144.
- Gerfen CR. Molecular effects of dopamine on striatal-projection pathways. *Trends Neurosci*. 2000 Oct;23(10 Suppl):S64-70. doi: 10.1016/s1471-1931(00)00019-7. PMID: 11052222.
- Gershman SJ & Uchida N Believing in dopamine. *Nat. Rev. Neurosci* 20, 703–714 (2019). [PubMed: 31570826]
- Gonon, F., Burie, J.B., Jaber, M., Benoit-Marand, M., Dumartin, B., Bloch, B., 2000. Geometry and kinetics of dopaminergic transmission in the rat striatum and in mice lacking the dopamine transporter. *Prog. Brain Res*. 125, 291-302.
- Goodman WK, McDougale CJ, Price LH, Riddle MA, Pauls DL, Leckman JF. Beyond the serotonin hypothesis: a role for dopamine in some forms of obsessive compulsive disorder? *J Clin Psychiatry*. 1990 Aug;51 Suppl:36-43; discussion 55-8. PMID: 2199433.
- Grace A. A., Bunney B. S., The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: Single spike firing. *J. Neurosci*. 4, 2866–2876 (1984).
- Grace A. A., Bunney B. S., The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: Burst firing. *J. Neurosci*. 4, 2877–2890 (1984)

- Grace AA Dysregulation of the dopamine system in the pathophysiology of schizophrenia and depression. *Nat. Rev. Neurosci* 17, 524–532 (2016). [PubMed: 27256556]
- Grace AA, Floresco SB, Goto Y, Lodge DJ (2007) Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors. *Trends Neurosci* 30:220–227. CrossRef Medline
- Greengard P (2001) The neurobiology of slow synaptic transmission. *Science* 294: 1024–1030
- Grenhoff J, Svensson T H (1989) Clonidine modulates dopamine cell firing in rat ventral tegmental area. *Eur J Pharmacol* 165
- Gu, H., Wall, S.C & Rudnick, G. Stable expression of biogenic amine transporters reveals differences in inhibitory sensitivity, kinetics, and ion dependence. *J. Biol. Chem.* 269, 7124-7130 (1994)
- Herlitze S, Garcia DE, Mackie K, Hille B, Scheuer T, Catterall WA (1996) Modulation of Ca²⁺ channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 380:258–262.
- Hong, W.C., Amara, S.G., 2013. Differential targeting of the dopamine transporter to recycling or degradative pathways during amphetamine-or PKC-regulated endocytosis in dopamine neurons. *Faseb. J.* 27 (8), 2995–3007.
- Hunger L, Kumar A, Schmidt R. Abundance Compensates Kinetics: Similar Effect of Dopamine Signals on D1 and D2 Receptor Populations. *J Neurosci.* 2020 Apr 1;40(14):2868-2881. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1951-19.2019. Epub 2020 Feb 18. PMID: 32071139; PMCID: PMC7117896.
- Ingram, S.L., Prasad, B.M., Amara, S.G., 2002. Dopamine transporter mediated conductances increase excitability of midbrain dopamine neurons. *Nat. Neurosci.* 5, 971– 978.
- Jans DA, Peters R, Jans P, Fahrenholz F. Vasopressin V2-receptor mobile fraction and ligand dependent adenylate cyclase activity are directly correlated in LLC-PK1 renal epithelial cells. *J Cell Biol* 1991;114(1):53–60.
- Jones, S.R., Gainetdinov, R.R., Jaber, M., Giros, B., Wightman, R.M., Caron, M.G., 1998. Profound neuronal plasticity in response to inactivation of the dopamine transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (7), 4029–4034.
- Konova AB, Ceceli AO, Horga G, Moeller SJ, Alia-Klein N, Goldstein RZ. Reduced neural encoding of utility prediction errors in cocaine addiction. *Neuron.* 2023 Dec 20;111(24):4058-4070.e6. doi: 10.1016/j.neuron.2023.09.015. Epub 2023 Oct 25. PMID: 37883973; PMCID: PMC10880133.
- Krueger, B. K. Kinetics and block of dopamine uptake in synaptosomes from rat caudate nucleus. *J. Neurochem.* 55, 260-267 (1990)
- Lammel S, Hetzel A, Häckel O, Jones I, Liss B, Roeper J. Unique properties of mesoprefrontal neurons within a dual mesocorticolimbic dopamine system. *Neuron.* 2008 Mar 13;57(5):760-73. doi: 10.1016/j.neuron.2008.01.022. PMID: 18341995.
- Laporte SA, Miller WE, Kim KM, and Caron MG (2002) beta-Arrestin/AP-2 interaction in G protein-coupled receptor internalization: identification of a beta-arrestin binding site in beta 2-adaptin. *J Biol Chem* 277:9247–9254.
- Lee FJ, Xue S, Pei L, et al. Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor. *Cell* 2002;111(2):219–30.
- Lee, F.J., Pei, L., Moszczynska, A., Vukusic, B., Fletcher, P.J., Liu, F., 2007. Dopamine transporter cell surface localization facilitated by a direct interaction with the dopamine D2 receptor. *EMBO J.* 26 (8), 2127–2136.

- Lieberman OJ, McGuirt AF, Mosharov EV, Pigulevskiy I, Hobson BD, Choi S, et al. Dopamine Triggers the Maturation of Striatal Spiny Projection Neuron Excitability during a Critical Period. *Neuron*. 2018;99(3):540-54 e4
- Loder, M.K., Melikian, H.E., 2003. The dopamine transporter constitutively internalizes and recycles in a protein kinase C-regulated manner in stably transfected PC12 cell lines. *J. Biol. Chem.* 278 (24), 22168–22174.
- Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG, and Lefkowitz RJ (1990) beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* **248**:1547–1550
- Luttrell LM, Ferguson SS, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della Rocca GJ, Lin F, Kawakatsu H, Owada K, Luttrell DK, et al. (1999) Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* **283**: 655–661.
- Margolis EB, Lock H, Hjelmstad GO, Fields HL. 2006b. The ventral tegmental area revisited: Is there an electrophysiological marker for dopaminergic neurons? *J. Physiol.* 577(Pt. 3):907–24
- McDougle CJ. Update on pharmacological management of OCD: agents and augmentation. *J Clin Psychiatry* 1997; 58 (suppl 12): 11-17
- Meiergerd S. M., Patterson T. A., and Schenk J. O. (1993) D2 receptors may modulate the function of the striatal transporter for dopamine: kinetic evidence from studies in vitro and in vivo. *J. Neurochem.* 61, 764–767
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev.* 1998 Jan;78(1):189-225. doi: 10.1152/physrev.1998.78.1.189. PMID: 9457173.
- Mohebi A, Pettibone JR, Hamid AA, Wong JT, Vinson LT, Patriarchi T, Tian L, Kennedy RT, Berke JD. Dissociable dopamine dynamics for learning and motivation. *Nature*. 2019 Jun;570(7759):65-70. doi: 10.1038/s41586-019-1235-y. Epub 2019 May 22. Erratum in: *Nature*. 2019 Jul;571(7763):E3. doi: 10.1038/s41586-019-1353-6. PMID: 31118513; PMCID: PMC6555489. Anzalone A, Lizardi-Ortiz JE, Ramos M, De Mei C, Hopf FW, Iaccarino C, Halbout B, Jacobsen J, Kinoshita C, Welter M, Caron MG, Bonci A, Sulzer D, Borrelli E (2012) Dual control of dopamine synthesis and release by presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors. *J Neurosci* 32:9023–9034
- Moritz, A.E., Rastedt, D.E., Stanislawski, D.J., Shetty, M., Smith, M.A., Vaughan, R.A., Foster, J.D., 2015. Reciprocal phosphorylation and palmitoylation control dopamine transporter kinetics. *J. Biol. Chem.* 290 (48), 29095–29105
- Mortensen OV, Amara SG. Dynamic regulation of the dopamine transporter. *Eur J Pharmacol.* 2003 Oct 31;479(1-3):159-70. doi: 10.1016/j.ejphar.2003.08.066. PMID: 14612147.
- Pakkenberg, B., Moller, A., Gundersen, H.J., Mouritzen Dam, A. & Pakkenberg, H. (1991) The absolute number of nerve cells in substantia nigra in normal subjects and in patients with Parkinson's disease estimated with an unbiased stereological method. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 54, 30–33
- Parsons L. H., Schad C. A., and Justice J. B. Jr. (1993) Co-administration of the D2 antagonist pimozide inhibits up-regulation of dopamine release and uptake induced by repeated cocaine. *J. Neurochem.* 60, 376–379.
- Pauls DL, Abramovitch A, Rauch SL, Geller DA. Obsessive-compulsive disorder: an integrative genetic and neurobiological perspective. *Nat Rev Neurosci.* 2014 Jun;15(6):410-24. doi: 10.1038/nrn3746. PMID: 24840803.
- Pierce KL, Premont RT, and Lefkowitz RJ (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**:639–650.
- Pierce RC, Kalivas PW. Locomotor behavior. *Curr Protoc Neurosci.* 2007 Jul;Chapter 8:Unit 8.1. doi: 10.1002/0471142301.ns0801s40. PMID: 18428664.

- Pitcher JA, Freedman NJ, and Lefkowitz RJ (1998) G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem* **67**:653–692.
- Premont RT and Gainetdinov RR (2007) Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annu Rev Physiol* **69**:511–534.
- Premont RT, Inglese J, and Lefkowitz RJ (1995) Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors. *Faseb J* **9**:175–182
- Pucadyil TJ, Kalipatnapu S, Harikumar KG, Rangaraj N, Karnik SS, Chattopadhyay A. G-protein-dependent cell surface dynamics of the human serotonin1A receptor tagged to yellow fluorescent protein. *Biochemistry* 2004;43(50):15852–62.
- Richfield EK, Penney JB & Young AB Anatomical and affinity state comparisons between dopamine D1 and D2 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 30, 767–777 (1989). [PubMed: 2528080]
- Roberts AC, De Salvia MA, Wilkinson LS, et al. 6-Hydroxydopamine lesions of the prefrontal cortex in monkeys enhance performance on an analog of the Wisconsin Card
- Roth BL. DREADDs for Neuroscientists. *Neuron*. 2016 Feb 17;89(4):683-94. doi: 10.1016/j.neuron.2016.01.040. PMID: 26889809; PMCID: PMC4759656.tei
- Roth R H, Tam S-Y, Ida Y, Yang J-X, Deutch AY (1988) Stress and the mesocorticolimbic dopamine systems. *Ann NY Acad Sci* 537: 138-147
- Sahlholm K, Marcellino D, Nilsson J, Fuxe K, Arhem P. Differential voltage-sensitivity of D2-like dopamine receptors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Sep 26;374(3):496-501. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.07.052. Epub 2008 Jul 22. PMID: 18652803.
- Schäfer AM, Meyer Zu Schwabedissen HE, Bien-Möller S, Hubeny A, Vogelgesang S, Oswald S, Grube M. OATP1A2 and OATP2B1 Are Interacting with Dopamine-Receptor Agonists and Antagonists. *Mol Pharm*. 2020 Jun 1;17(6):1987-1995. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.0c00159. Epub 2020 May 8. PMID: 32343897.
- Schultz W (2007) Multiple dopamine functions at different time courses. *Annu Rev Neurosci* 30:259 –288. CrossRef Medline
- Schultz W., Getting formal with dopamine and reward. *Neuron* 36, 241–263 (2002)
- Schultz, W. and Dickinson, A. (2000) Neuronal coding of prediction errors. *Annu. Rev. Neurosci.* 23, 473–500
- Scott L, Zelenin S, Malmersjo S, et al. Allosteric changes of the NMDA receptor trap diffusible dopamine 1 receptors in spines. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(3): 762–7.
- Simon H (1981) Dopaminergic A10 neurons and the frontal system. *J Physiol* 77: 81-95
- Skinbjerg M, Sibley DR, Javitch JA, Abi-Dargham A (2012) Imaging the high-affinity state of the dopamine D2 receptor in vivo: fact or fiction? *Biochem Pharmacol* 83:193–198.
- Sokoloff P, Diaz J, Le Foll B, Guillin O, Leriche L, Bezard E, Gross C. The dopamine D3 receptor: a therapeutic target for the treatment of neuropsychiatric disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2006 Feb;5(1):25-43. doi: 10.2174/187152706784111551. PMID: 16613552.
- Sokolowski J D, Salamone J D (1994) Effects of dopamine depletions in the medial prefrontal cortex on DRL performance and motor activity in the rat. *Brain Res* 642: 20-28
- Sort Test: possible interactions with subcortical dopamine. *J Neurosci* 1994;14(5 Pt 1): 2531–44.

- Surmeier DJ, Graves SM & Shen W Dopaminergic modulation of striatal networks in health and Parkinson's disease. *Curr. Opin. Neurobiol* 29, 109–117 (2014). [PubMed: 25058111]
- Swanson LW. 1982. The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res. Bull.* 9:321–53
- Szechtman H, Sulis W, Eilam D. Quinpirole induces compulsive checking behavior in rats: a potential animal model of obsessive-compulsive disorder (OCD). *Behav Neurosci* 1998; 112: 1475-1485
- Szumliński KK, Goodwill AM, Szechtman H. Locomotor sensitization to quinpirole in rats: effects of drug abstinence and sex. *Psychopharmacology (Berl)*. 2000 Oct;152(3):304-11. doi: 10.1007/s002130000538. PMID: 11105941.
- Thierry AM, Tassin JP, Blanc G, Glowinski J (1976) Selective activation of the mesocortical DA system by stress. *Nature* 263: 242-244
- Tritsch NX, Ding JB, Sabatini BL. Dopaminergic neurons inhibit striatal output through non-canonical release of GABA. *Nature*. 2012 Oct 11;490(7419):262-6. doi: 10.1038/nature11466. Epub 2012 Oct 3. PMID: 23034651; PMCID: PMC3944587.
- Truong JG, Newman AH, Hanson GR, Fleckenstein AE (2004) Dopamine D2 receptor activation increases vesicular dopamine uptake and redistributes vesicular monoamine transporter-2 protein. *Eur J Pharmacol* 504:27–32.
- Urban DJ, Roth BL. DREADDs (designer receptors exclusively activated by designer drugs): chemogenetic tools with therapeutic utility. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2015;55:399-417. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010814-124803. Epub 2014 Sep 25. PMID: 25292433.
- Uziel 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. doi: 10.1038/35041572. PMID: 11089973.
- Vaaga, C. E.; Yorgason, J. T.; Williams, J. T.; Westbrook, G. L. Presynaptic gain control by endogenous cotransmission of dopamine and GABA in the olfactory bulb. *J. Neurophysiol.* 2017, 117, 1163- 1170.
- Vallone D, Picetti R, Borrelli E. Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev*. 2000 Jan;24(1):125-32. doi: 10.1016/s0149-7634(99)00063-9. PMID: 10654668.
- Van Wieringen JP, Booij J, Shalgunov V, Elsinga P, Michel MC (2013) Agonist high- and low-affinity states of dopamine D(2) receptors: methods of detection and clinical implications. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 386:135–154
- Vaughan, R.A., Foster, J.D., 2013. Mechanisms of dopamine transporter regulation in normal and disease states. *Trends Pharmacol. Sci.* 34 (9), 489–496.
- Venton BJ, Cao Q. Fundamentals of fast-scan cyclic voltammetry for dopamine detection. *Analyst*. 2020 Feb 17;145(4):1158-1168. doi: 10.1039/c9an01586h. PMID: 31922176; PMCID: PMC7028514.
- Venton BJ et al. Real-time decoding of dopamine concentration changes in the caudate-putamen during tonic and phasic firing. *J. Neurochem* 87, 1284–1295 (2003). [PubMed: 14622108]
- Vezina P. Amphetamine injected into the ventral tegmental area sensitizes the nucleus accumbens dopaminergic response to systemic amphetamine: an in vivo microdialysis study in the rat. *Brain Res.* 1993 Mar 12;605(2):332-7. doi: 10.1016/0006-8993(93)91761-g. PMID: 8386970.
- Wolf ME, Roth RH (1990) Autoreceptor regulation of dopamine synthesis. *Ann N Y Acad Sci* 604:323–343.

Yorgason JT, España RA, Jones SR. Demon voltammetry and analysis software: analysis of cocaine-induced alterations in dopamine signaling using multiple kinetic measures. *J Neurosci Methods*. 2011 Nov 15;202(2):158-64. doi: 10.1016/j.jneumeth.2011.03.001. Epub 2011 Mar 8. PMID: 21392532; PMCID: PMC3149733.

Zahrt J, Taylor J R, Arnsten A F T (1996) Supranormal stimulation of dopamine D1 receptors in the prefrontal cortex impairs spatial working memory in rats. *Soc Neurosci Abstr* 22:1128