

**MEDICIÓN DE LOS NIVELES DE RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS EN EL NUCLEUS
ACCUMBENS DE RATONES CON INHIBICIÓN CRÓNICA DE LA ACTIVIDAD DOPAMINÉRGICA**

Tesis entregada a

LA UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO

En Cumplimiento Parcial de los requisitos para optar al grado de

Magister en Ciencias Biológicas con Mención Neurociencias

Facultad de Ciencias

Por

Nelson Andrés Urrea Jara

Diciembre/2025

Dirigida por: Dra. Angélica Escobar Maldonado

Codirigido por: Dr. Pablo Moya

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO
INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por: Nelson Andrés Urrea Jara

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias con mención en Neurociencia, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día XX del Mes de XXXX de 20XX

Directora de Tesis:

Dra. Angélica Escobar

Codirector de Tesis:

Dr. Pablo Moya

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Ramón Sotomayor

Dra. María Estela Andrés

INDICE

RESUMEN	4
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN	6
Trastorno Obsesivo-Compulsivo: características clínicas y tratamiento	6
Neurobiología del TOC: circuitos estriatales y señalización dopaminérgica	7
Implicación del sistema dopaminérgico en el TOC	9
Modelo de sensibilización con quinpirol como aproximación al TOC	10
Modulación del receptor dopaminérgico D₂ en condiciones de déficit sostenido de dopamina en el estriado	13
Inhibición dopaminérgica mediante quimiogenética	15
Hipótesis	17
Objetivo General	17
Objetivos Específicos	17
MATERIALES Y MÉTODOS	18
RESULTADOS	22
Discusión	30
Conclusión	34
Referencias	35
Anexo	40

RESUMEN

La dopamina cumple un rol esencial en la modulación de la motivación, el aprendizaje por refuerzo y la ejecución de conductas dirigidas a objetivos. Alteraciones en este sistema se han vinculado con diversos trastornos psiquiátricos, incluido el trastorno obsesivo compulsivo (TOC), donde se ha propuesto un desequilibrio entre las vías directa e indirecta del cuerpo estriado mediado por los receptores D_1 y D_2 . Sin embargo, los mecanismos celulares que subyacen a estas alteraciones aún no están completamente dilucidados.

En este estudio se evaluaron los efectos de la inhibición crónica de las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral (VTA) mediante el uso de quimiogenética, a través del receptor DREADD inhibitorio hM4Di, el que fue activado por la administración repetida del agonista compuesto 21 (C21), en ratones TH-Cre. Se registró la actividad locomotora durante el tratamiento y al finalizar, se analizó los niveles del receptor dopaminérgico D_2 (D_2R) en el núcleo accumbens (NAc) mediante Western blot.

La inhibición crónica de las neuronas dopaminérgicas mesolímbicas no produjo cambios significativos en la actividad locomotora ni en los niveles proteicos de D_2R (formas glicosilada y D_2L) en el NAc. Los intentos de visualizar D_2R mediante inmunofluorescencia no mostraron señal específica, lo cual concuerda con la baja reactividad de ciertos anticuerpos frente a este receptor en tejidos fijados.

Estos resultados indican que la inhibición dopaminérgica inducida por la activación del hM4Di, no desencadena una regulación compensatoria del D_2R ni modificaciones conductuales detectables, lo que sugiere la existencia de mecanismos homeostáticos que preservan la estabilidad funcional del sistema dopaminérgico. El presente estudio aporta evidencia sobre la plasticidad mesolímbica bajo condiciones de hipodopaminergia y contribuye a la limitada literatura que utiliza modelos murinos para estudiar la modulación dopaminérgica en circuitos asociados al TOC.

ABSTRACT

Dopamine plays an essential role in modulating motivation, reinforcement learning, and the execution of goal-directed behaviors. Alterations in this system have been linked to various psychiatric disorders, including obsessive compulsive disorder (OCD), where an imbalance between the direct and indirect pathways of the striatum, mediated by D₁ and D₂ receptors, has been proposed. However, the cellular mechanisms underlying these alterations are not yet fully understood.

This study evaluated the effects of chronic inhibition of dopaminergic neurons in the ventral tegmental area (VTA) using chemogenetics via the inhibitory DREADD receptor hM4Di, which was activated by repeated administration of the agonist compound 21 (C21), in TH-Cre mice. Locomotor activity was recorded during treatment, and upon completion, the levels of the dopamine D₂ receptor (D₂R) in the nucleus accumbens (NAc) were analyzed via Western blot.

Chronic inhibition of mesolimbic dopaminergic neurons did not produce significant changes in locomotor activity or in the protein levels of D₂R (glycosylated and D₂L forms) in the NAc. Attempts to visualize D₂R via immunofluorescence showed no specific signal, which is consistent with the low reactivity of certain antibodies against this receptor in fixed tissue.

These results indicate that the dopaminergic inhibition induced by hM4Di activation does not trigger compensatory regulation of D₂R or detectable behavioral modifications, suggesting the existence of homeostatic mechanisms that preserve the functional stability of the dopaminergic system. The present study provides evidence on mesolimbic plasticity under hypodopaminergic conditions and contributes to the limited literature using murine models to study dopaminergic modulation in circuits associated with OCD.

INTRODUCCIÓN

Trastorno Obsesivo-Compulsivo: características clínicas y tratamiento

El trastorno obsesivo-compulsivo (TOC) es un trastorno neuropsiquiátrico heterogéneo que se caracteriza por la presencia de obsesiones y/o compulsiones. Las obsesiones son pensamientos intrusivos, recurrentes y persistentes no deseados. Las compulsiones son conductas repetitivas o actos mentales que una persona se siente impulsada a realizar en respuesta a las obsesiones (Bokor & Anderson, 2014). Este trastorno afecta entre el 1% y el 3% de la población mundial, lo que lo convierte en una de las condiciones psiquiátricas más comunes (Jalal et al., 2023). Los pacientes que padecen TOC experimentan una amplia variedad de obsesiones y compulsiones, las cuales pueden diferir en su nivel de intensidad. No obstante, los síntomas suelen seguir un patrón común. Primero aparecen pensamientos obsesivos que generan ansiedad. Como reacción a estas obsesiones, se llevan a cabo compulsiones que ofrecen un alivio de la ansiedad. Sin embargo, este alivio es temporal, ya que los pensamientos intrusivos vuelven a manifestarse, reiniciando así el ciclo (Hiebert et al., 2020). El *Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales*, quinta edición (DSM-5), clasifica al TOC dentro del capítulo “Trastornos obsesivo-compulsivos y trastornos relacionados” y establece que, para su diagnóstico, es necesaria la presencia de obsesiones, compulsiones o ambas (Association, 2013).

Los tratamientos más utilizados para el trastorno obsesivo-compulsivo (TOC) son la terapia cognitivo-conductual que puede estar o no acompañada de tratamientos farmacológicos. Aunque los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) constituyen el principal tratamiento farmacológico, entre el 40% y el 60% de los pacientes no responden adecuadamente a este enfoque y continúan manifestando conductas compulsivas (Pittenger, C., & Bloch, M. H. (2014). Esto sugiere que, además de la serotonina, podrían estar involucradas alteraciones en otros sistemas de neurotransmisores, lo que indicaría que la etiología del TOC es más compleja y no se limita a un único sistema neuroquímico (Hirschtritt et al., 2017). Así, otros sistemas de neurotransmisores cuyas alteraciones podrían subyacer a la etiología del TOC son el glutamato y el sistema dopaminérgico meso-estriatal y mesolímbico.

Neurobiología del TOC: circuitos estriatales y señalización dopaminérgica

El trastorno obsesivo compulsivo se asocia con una hiperactividad del circuito cortico-estriado-talamocortical (CSTC)(Milad & Rauch, 2012) . Este circuito incluye la corteza orbitofrontal, el cuerpo estriado (incluido el NAc), el globo pálido, el tálamo y retorna a la corteza y parte de sus funciones es regular la ejecución y supresión de conductas. Una activación anómala y sostenida de esta red se ha observado consistentemente en pacientes con TOC y se ha correlacionado con la severidad de los síntomas compulsivos (Menzies et al., 2008; Milad & Rauch, 2012). En particular, el NAc cumple un rol integrador clave entre la motivación y la acción, y su disfunción ha sido propuesta como una de las bases neurales de la compulsividad. A nivel funcional, se ha planteado que un desequilibrio entre las vías directa e indirecta del estriado podría subyacer a los síntomas del TOC(Bariselli et al., 2019). Un predominio de la actividad en la vía directa (facilitada por la señalización D₁R) junto con una inhibición deficiente de la vía indirecta (regulada por D₂R) podría llevar a una facilitación excesiva de acciones repetitivas y la imposibilidad de suprimirlas. Este desequilibrio puede estar mediado tanto por alteraciones en la liberación de dopamina como por una regulación diferencial de los receptores dopaminérgicos.

En este contexto, resulta relevante examinar con mayor detalle el papel de la vía mesolímbica, una de las principales rutas dopaminérgicas implicadas en la fisiopatología del TOC (Tastevin et al., 2019). Esta vía está formada por neuronas dopaminérgicas cuyos cuerpos celulares se localizan en el área tegmental ventral (VTA) y cuyos axones proyectan hacia el núcleo accumbens (NAc), que forma parte del estriado ventral. En el NAc, estas neuronas hacen sinapsis con neuronas GABAérgicas de proyección (Gerfen & Surmeier, 2011). Las salidas neuronales del NAc se conocen como neuronas espinosas medias (MSN), las cuales se clasifican en dos grupos según sus destinos de proyección axonal. Las MSN que se proyectan directamente al mesencéfalo forman la vía directa (dMSN), mientras que aquellas que se proyectan de manera indirecta, a través de dos vías sinápticas, constituyen la vía indirecta (iMSN) (Alexander & Crutcher, 1990; Hedreen & DeLong, 1991). La activación de la vía directa (dMSN) y la vía indirecta (iMSN) determina si el animal se acerca o evita un estímulo, respectivamente (Bariselli et al., 2019). Estas dos poblaciones de neuronas están moduladas de forma diferencial por los receptores dopaminérgicos D1 (D₁R) y D2 (D₂R), ambos acoplados

a proteínas G. Mientras que D₁R activa la vía de señalización G_s, favoreciendo la excitabilidad neuronal, D₂R activa la vía G_{i/o}, ejerciendo un efecto inhibitor, por medio de la inhibición del adenilato ciclasa por proteína G_α y canales de Ca²⁺ y la activación de canales de K⁺, lo que hiperpolariza la neurona (Calabresi et al., 2014). En el cuerpo estriado, los D₁R se expresan principalmente en las dMSN, mientras que los D₂R predominan en las iMSN (Bertran-Gonzalez et al., 2008; Deng et al., 2006). Por tanto, la liberación de dopamina promueve la activación de la vía directa y la inhibición de la indirecta, facilitando así la ejecución de conductas motoras. Un aumento de la señal dopaminérgica en este circuito puede contribuir a la expresión de comportamientos repetitivos, como los observados en el TOC (Seiler et al., 2022; Tritsch & Sabatini, 2012).

Dado que los D₂R cumplen funciones centrales en esta dinámica, es relevante considerar que existen al menos dos isoformas principales de este receptor, generadas por splicing alternativo: la forma larga (D₂L) y la forma corta (D₂S). Estas variantes difieren en la longitud de su dominio intracelular y en su localización funcional. Mientras que el D₂L contiene una inserción 29 aminoácidos (PM~50 kDa) se encuentra mayoritariamente en neuronas postsinápticas, el D₂S (PM~45 kDa) se expresa principalmente en las neuronas dopaminérgicas como autorreceptor presináptico, donde regula la liberación de dopamina y la excitabilidad celular (Centonze et al., 2002a; Fishburn et al., 1995; A., B. JH., R.-P. F. et al. Usiello, 2000). Además, los D₂R pueden sufrir modificaciones postraduccionales como la glicosilación, un proceso que afecta su tráfico, estabilidad en membrana y capacidad de señalización (Fishburn et al., 1995; A., B. JH., R.-P. F. et al. Usiello, 2000). La glicosilación ocurre en residuos específicos del dominio extracelular del receptor y puede influir en su localización subcelular, su sensibilidad al ligando y su vida media en la membrana plasmática (Cho et al., 2012). Por lo tanto, distinguir entre formas glicosiladas y no glicosiladas del D₂R, así como entre isoformas D₂L y D₂S, permite obtener información más precisa sobre los posibles cambios en la señalización dopaminérgica bajo condiciones experimentales que alteran la homeostasis del sistema.

Un aspecto adicional relevante para comprender la regulación de la señal dopaminérgica es el control presináptico de la liberación y recaptación de dopamina. En este contexto, el transportador de dopamina (DAT) permite la recaptación activa del neurotransmisor hacia la

neurona presináptica, manteniendo su homeostasis y facilitando su reutilización (Foster & Vaughan, 2017). Paralelamente, los receptores D₂ funcionan como autorreceptores, ubicados tanto en el soma como en los terminales axónicos, donde ejercen una retroalimentación negativa que regula la excitabilidad neuronal y la liberación de dopamina. Estos mecanismos de autorregulación pueden verse comprometidos en condiciones de disfunción dopaminérgica como las observadas en modelos preclínicos del TOC (Chen et al., 2020; Ford, 2014)

Implicación del sistema dopaminérgico en el TOC

Estudios de neuroimagen en personas con TOC han mostrado alteraciones en la disponibilidad de receptores dopaminérgicos D₁ y D₂ en el estriado y la corteza cingulada anterior (Denys et al., 2004; Olver et al., 2009). Algunos trabajos en humanos con TOC, mediante técnicas de neuroimagen como la tomografía por emisión de positrones (PET), han reportado una disminución en la disponibilidad de receptores D₂/ D₃ en el cuerpo estriado, particularmente en el putamen (Denys et al., 2004). En contraste, estudios en modelos animales como el de sensibilización inducida por quinpirol en ratas (considerado un modelo preclínico del TOC) han mostrado un aumento en la expresión de receptores D₂ en el cuerpo estriado mediante Western blot, lo que podría reflejar una adaptación compensatoria del sistema dopaminérgico (Klanker et al., 2013) (Culver et al., 2008). Estos hallazgos, en ocasiones contradictorios, indican que el TOC no puede ser explicado simplemente por un estado hiper o hipo dopaminérgico, sino por un desequilibrio funcional dentro de los circuitos dopaminérgicos. Medir la expresión de receptores dopaminérgicos permite una aproximación indirecta a este equilibrio, ya que su regulación (incluyendo su internalización, reciclaje o síntesis) depende de la afinidad y exposición crónica a la dopamina en el entorno sináptico. Por ejemplo, niveles elevados de DA pueden inducir una disminución de la expresión en membrana de receptores postsinápticos (especialmente D₂R, con mayor afinidad por DA), mientras que un déficit prolongado podría aumentar su expresión en membrana (Gainetdinov et al., 2004; Missale et al., 1998). En este contexto, caracterizar los niveles de D₁R y D₂R en modelos animales con conductas compulsivas permite profundizar en los mecanismos neurobiológicos que subyacen al TOC, en particular aquellos relacionados con el desequilibrio de las vías dopaminérgicas estriatales.

En este sentido, alteraciones crónicas de los niveles de dopamina podrían alterar la afinidad y la respuesta de sus receptores y contribuir al fenotipo compulsivo. De hecho, la administración crónica de quinpirol, un agonista de receptores D₂ induce un fenotipo compulsivo en ratas y ratones (de Haas et al., 2010; Szechtman et al., 1998), sugiriendo que la activación crónica de D₂R es suficiente para generar conductas repetitivas, como será desarrollado en el siguiente apartado.

Modelo de sensibilización con quinpirol como aproximación al TOC

El modelo de administración repetida de quinpirol (QNP), un agonista de los receptores dopaminérgicos D₂ y D₃, ha sido ampliamente utilizado como aproximación experimental al TOC (de Haas et al., 2010). Este modelo presenta una alta validez aparente, ya que induce en roedores patrones motores repetitivos (Escobar et al., 2015), conductas de “chequeo” compulsivo (Szechtman et al., 2001) e inflexibilidad cognitiva (Szechtman et al., 1998, 2001), comportamientos comparables a los síntomas observados en pacientes con TOC. También exhibe validez predictiva, dado que dichas conductas pueden ser parcialmente revertidas mediante la administración de inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS), que constituyen la primera línea terapéutica en humanos. Finalmente, posee validez constructiva, al basarse en alteraciones dopaminérgicas estriatales que han sido implicadas en la fisiopatología del TOC tanto en modelos animales como en estudios clínicos (Stuchlik et al., 2016; Szechtman et al., 1998).

Además de las conductas descritas anteriormente, la administración repetida de QNP induce sensibilización locomotora (Figura 1), es decir, un aumento progresivo en la locomoción luego de la administración de una dosis del psicofármaco.

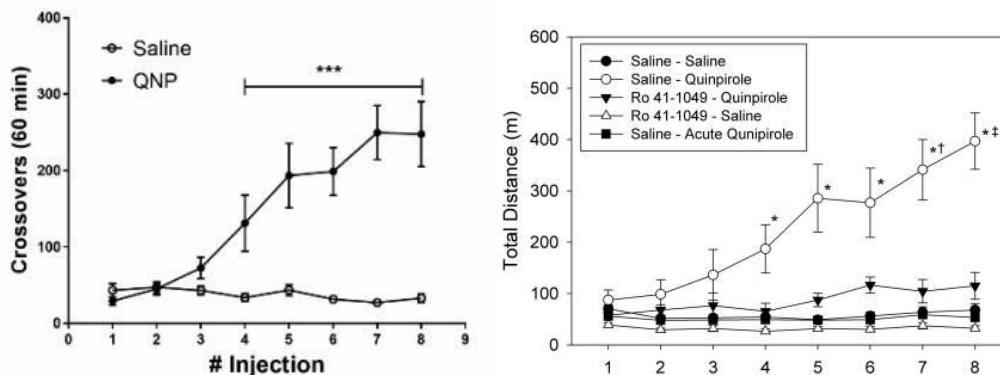


Figura 1: La administración repetida de QNP induce sensibilización locomotora, en comparación a los animales que recibieron solución salina(Culver et al., 2008; Escobar et al., 2015).

Esta conducta se ha pensado que subyace a la generación de otras conductas compulsivas(de Haas et al., 2010; Szechtman et al., 1998) .A nivel molecular, y en particular en el núcleo accumbens (NAc), el QNP activa los receptores D_2 presinápticos en las neuronas dopaminérgicas, reduciendo la concentración de dopamina extracelular(de Haas et al., 2010). A nivel postsináptico, el QNP se une y activa los receptores D_2 en las neuronas espinosas medias indirectas (iMSN), lo que provoca su inhibición(de Haas et al., 2010) (Figura 2).

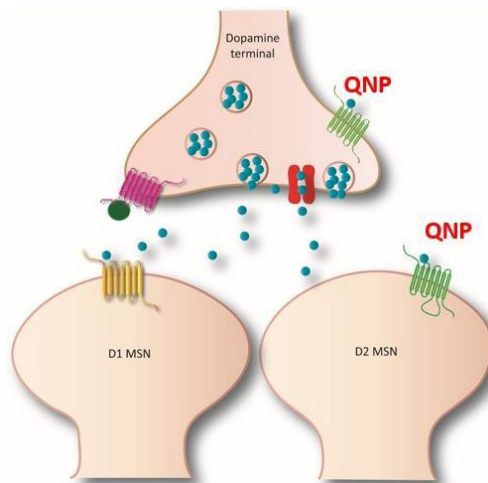


Figura 2: Unión del quinpirol (QNP) a los receptores D_2 en las neuronas dopaminérgicas pre y post sinápticas.

Este tratamiento crónico produce una potenciación progresiva de la actividad locomotora y de los comportamientos compulsivos, lo que ha sido interpretado como resultado de mecanismos de plasticidad neuronal que incrementan la sensibilidad de los receptores D₂R en la vía indirecta. El aumento de la actividad locomotora ocurre inmediatamente después de la administración de QNP, pero no durante los períodos de reposo, lo que sugiere que la ejecución del comportamiento compulsivo depende de la activación de D₂R y su sensibilización en las iMSN. Así, la activación repetida de D₂R por QNP produciría una inhibición sostenida de estas neuronas, reduciendo el tono inhibitorio sobre la actividad locomotora propio de la vía indirecta. Esta desinhibición funcional del estriado favorece la expresión de acciones repetitivas, ya que el animal pierde la capacidad de suprimir respuestas motoras. Así, la sensibilización conductual inducida por QNP refleja un desequilibrio a favor de la vía directa, coherente con el incremento de comportamientos compulsivos observado en este modelo. Además, se ha observado que esta sensibilización conductual es dependiente del número de administraciones, lo que permite estudiar la progresión temporal de los cambios neurobiológicos asociados (Escobar et al., 2015).

Desde una perspectiva neuroquímica, la sensibilización inducida por QNP se asocia con una reducción sostenida de los niveles basales de dopamina en el NAc, lo que ha sido demostrado mediante experimentos de microdiálisis realizados 48 horas después de la última dosis (Figura 3) (Escobar et al., 2015). Este estado de hipodopaminergia se ha propuesto como condición que favorece la compulsividad, ya que permite una hiperrespuesta de los D₂R cuando se activa el sistema dopaminérgico. De manera similar, pacientes con enfermedad de Parkinson, quienes presentan una disminución crónica de dopamina, han mostrado desarrollar conductas compulsivas en respuesta a fármacos agonistas dopaminérgicos, reforzando el vínculo entre hipodopaminergia y compulsividad (Ávila et al., 2011; Moore et al., 2014). Esto sugiere que la dopamina y la activación de D₂R son esenciales para la manifestación de conductas compulsivas, y que la reducción de dopamina en estado de reposo, cuando no hay actividad conductual, es una característica común en roedores y humanos con comportamientos compulsivos (Escobar et al., 2015; Koeltzow et al., 2003).

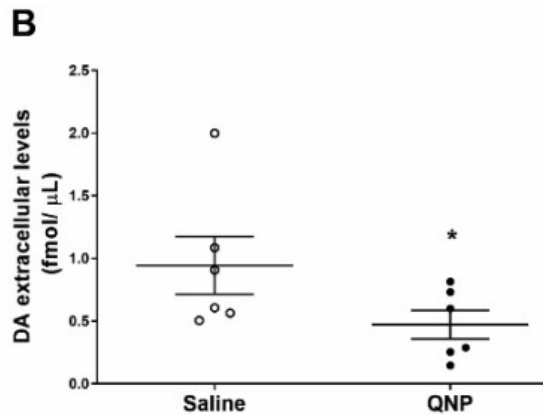


Figura 3: Niveles basales de dopamina en el cuerpo estriado medidos por microdiálisis en animales anestesiados 48 h después de la última inyección de QNP(Escobar et al., 2015)

Modulación del receptor dopaminérgico D₂ en condiciones de déficit sostenido de dopamina en el estriado

Como se mencionó anteriormente, al igual que los DAT, los receptores dopaminérgicos de tipo D₂ que se expresan en las neuronas dopaminérgicas, cumplen una función autorregulatoria clave. Su activación, tanto a nivel somático como en los terminales presinápticos, ejerce un efecto inhibitorio sobre la liberación de dopamina al espacio extracelular (Centonze et al., 2002b; A. Usiello et al., 2000). Estudios hechos en ratas demuestran que la administración crónica de QNP induce una disminución sostenida de los niveles de dopamina en el estriado. Este fenómeno se asoció con una respuesta inhibitoria potenciada frente a la administración aguda del agonista, manifestada por una inhibición más rápida de la liberación dopaminérgica(Escobar et al., 2015)(Figura 4), cuantificada mediante la técnica de voltametría cíclica de barrido rápido (FSCV).

Los cambios en los niveles de dopamina en el estriado podrían alterar el equilibrio en la actividad neuronal de las vías estriatales. Dado que los D₂R tienen una mayor afinidad por la dopamina que los D₁R, su activación se ve favorecida cuando los niveles extracelulares de dopamina son bajos, lo que resulta en la inhibición de iMSN (Asaoka et al., 2019; Escobar et al., 2015; Szechtman et al., 1998). Un cambio en este equilibrio, en donde se favorezca la

actividad de dMSN sobre iMSN (producto de la activación preferencial de D2R, la cual inhibe la iMSN) podría ser la base del desarrollo de conductas compulsivas.

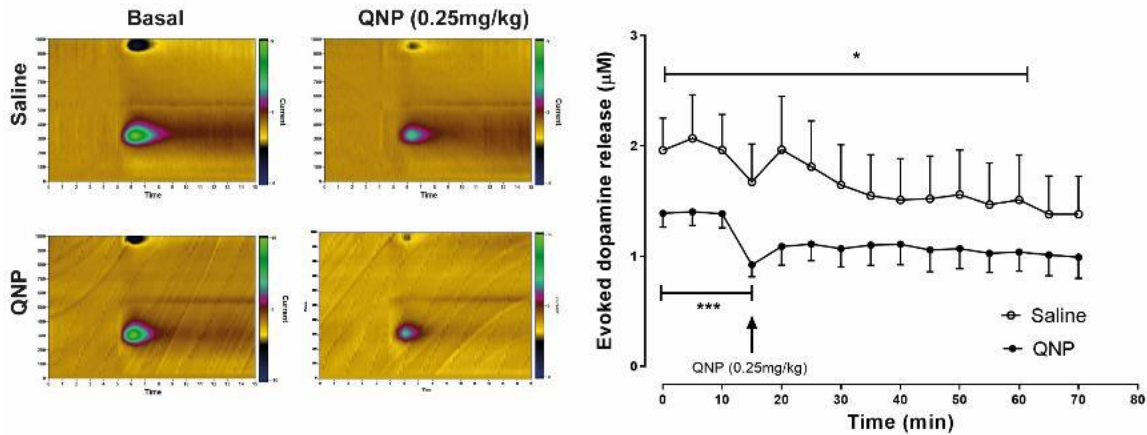


Figura 4: La administración intravenosa aguda de quinpirol induce una inhibición más rápida de la liberación de dopamina en ratas sensibilizadas con quinpirol.

Los resultados demuestran que el tratamiento prolongado con QNP, produce dos efectos neuroquímicos interrelacionados: (1) una disminución sostenida de los niveles de dopamina estriatal, y (2) una potenciación progresiva de la actividad locomotora en respuesta a administraciones repetidas del fármaco (Asaoka et al., 2019; Escobar et al., 2015; Szechtman et al., 1998). Este fenómeno, conocido como sensibilización locomotora, sugiere la existencia de mecanismos de plasticidad neuronal que incrementan la sensibilidad de los D₂R en la vía indirecta del estriado.

Complementariamente, estudios en modelos genéticos revelan que ratones con deficiencia de tirosina hidroxilasa, enzima clave para la síntesis de dopamina, presentan hiperactividad motora cuando se estimulan farmacológicamente los D₂R estriatales (Kim et al., 2000). Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que el déficit dopaminérgico induce un estado de hipersensibilidad en los receptores D₂ de la vía indirecta, lo que plantea interrogantes sobre su posible papel en la fisiopatología de las conductas compulsivas.

Inhibición dopaminérgica mediante quimiogenética

La disminución sostenida de los niveles de dopamina en el núcleo accumbens observada tras la administración repetida de QNP sugiere que un estado crónico de hipodopaminergia podría ser un componente clave en la expresión de conductas compulsivas. Sin embargo, aún no está claro si dicha reducción de la señal dopaminérgica actúa como un mecanismo causal que favorece la sensibilización conductual, o si se trata de una consecuencia secundaria del tratamiento con QNP. Para responder a esta interrogante, se requiere una herramienta experimental que permita manipular selectivamente y de manera sostenida la actividad de las neuronas dopaminérgicas.

Los DREADDs (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugsson) son receptores metabotrópicos modificados genéticamente para que pierdan su capacidad de respuesta a los ligandos fisiológicos naturales, pero puedan ser activados de manera selectiva mediante compuestos exógenos como el clozapina-N-óxido (CNO) o agonistas más recientes como el compuesto 21(C-21) (Jendryka et al., 2019). Esta herramienta, también llamada quimiogenética, permite activar o inhibir poblaciones neuronales específicas con el fin de estudiar su función y modular su actividad, aprovechando que los DREADDs activan las mismas vías de señalización intracelular que los receptores metabotrópicos presentes en las células (Jendryka et al., 2019; Tran et al., 2020). Una aplicación particularmente relevante de esta técnica es su capacidad para replicar los efectos inhibitorios característicos de los receptores D₂ sobre las neuronas dopaminérgicas, sin requerir la activación directa de estos receptores endógenos. La expresión de DREADDs en el sistema nervioso central puede realizarse de forma general o restringida a tipos celulares específicos. Para lograr una expresión selectiva, se emplea comúnmente la combinación de vectores virales adenoasociados (AAV) con sistemas condicionales, junto con la administración estereotáxica en la región cerebral de interés en modelos animales transgénicos. Entre las principales ventajas del enfoque quimiogenético destacan: su naturaleza farmacológicamente controlable, ya que la modulación neuronal depende de la administración de ligandos sintéticos; su menor grado de invasión anatómica en comparación con otras técnicas de modulación neuronal como la optogenética, que requiere la implantación de dispositivos físicos; y su idoneidad para

estudios de modulación neuronal prolongada, permitiendo evaluar efectos crónicos (Vlasov et al., 2018).

En esta tesis se utilizó el receptor hM4Di, un DREADD inhibitorio acoplado a proteínas Gi, el cual, al ser activado, reduce la excitabilidad neuronal a través de la inhibición de adenilato ciclasa y la activación de canales de potasio tipo GIRK (Figura 5). Mediante el uso de un sistema de expresión condicional dependiente de Cre recombinasa, se logró dirigir específicamente la expresión de hM4Di a neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral (VTA) en ratones TH-Cre, lo que permitió inducir una inhibición sostenida de la actividad dopaminérgica mesolímbica. La activación crónica de hM4Di mediante la administración sistémica de C21 durante varios días generó un estado de hipodopaminergia inducida artificialmente, que replicaría de forma controlada el perfil de reducción de dopamina descrito en el modelo de QNP. Como una aproximación para evaluar la respuesta postsináptica de los receptores D₂ luego de la inhibición quimiogénica crónica de la actividad dopaminérgica se evaluaron los niveles de receptores D₂ mediante pruebas de western blot.

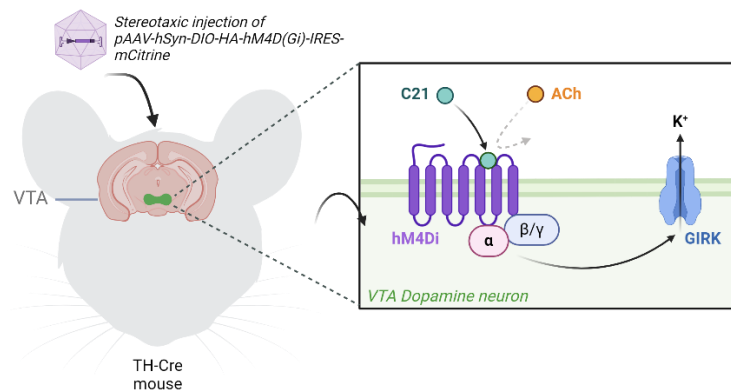


Figura 5: Inhibición quimiogénica de neuronas dopaminérgicas del VTA mediante expresión y activación de hM4Di

Hipótesis

Con base en los resultados previos, donde: La administración repetida de QNP induce sensibilización locomotora en comparación con los animales tratados con solución salina; los animales expuestos crónicamente a QNP muestran niveles reducidos de dopamina basal en el núcleo accumbens (NAc); y los ratones con inhibición quimiogénica de la actividad dopaminérgica presentan una potenciación de la sensibilización locomotora, se propone la siguiente hipótesis: **La inhibición crónica de la actividad dopaminérgica mesolímbica altera los niveles de las proteínas D₂R en el NAc.**

Objetivo General

Determinar los niveles proteicos de receptores dopaminérgicos D₂R en el NAc de ratones con inhibición crónica de la actividad dopaminérgica

Objetivos Específicos

- Inhibir crónicamente las neuronas dopaminérgicas mesolímbicas mediante quimiogénica.
- Medir los niveles de D₂R mediante Western-Blot e inmunofluorescencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratones TH-Cre macho y hembra adultas (12 hembras y 22 machos) de 3 a 8 meses, provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso. Antes de iniciar los experimentos los ratones fueron alojados en grupos de 4-5 individuos por jaula en la sala de mantención del Dr. Pablo Moya 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 tuvieron un período de aclimatación de 1 semana en la sala de mantención.

Todos los procedimientos se realizaron siguiendo los principios de reducción en el número de animales y minimización del dolor o incomodidad, 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 107-2024), por el Comité de Bioética de la Agencia Nacional de investigación (ANID) (CBC 89-2023); las condiciones de la sala de mantención fueron aprobadas por CICUAL(SAP-UVFC-2).

Materiales

Drogas:

-Compuesto 21 (C-21)

El C21 fue adquirido de Tocris (Cat N°6422). Se disolvió en solución salina al 0,9 % y se mantuvo a -20 °C antes de la prueba. Todas las inyecciones se administraron por vía intraperitoneal, a dosis de 3 mg/kg. Se preparó una solución vehículo (NaCl al 0,9 %) y se mantuvo en las mismas condiciones.

Virus:

-viral pAAV-hSyn-DIO-HA-hM4D(Gi)-IRES-mCitrine; Addgene plasmid #50455

Procedimientos experimentales

Inyección de virus Adenoasociado para expresión de DREADD inhibitor (hM4Di) en neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral (VTA)

Para modular selectivamente la actividad de las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral (VTA), se inyectó bilateralmente el vector viral pAAV-hSyn-DIO-HA-hM4D(Gi)-IRES-mCitrine en ratones TH-Cre, los cuales expresaban recombinasa Cre bajo el control del promotor de tirosina hidroxilasa (TH). Los animales fueron anestesiados con isoflurano (2-3% en aire a 0.5 L/min) y posicionados en un estereotáxico para la craneotomía y administración viral. Las inyecciones se realizaron de forma estereotáxica en las coordenadas AP = -3.2 mm, ML = \pm 0.5 mm y DV = -4.2 mm (según las coordenadas del atlas de Franklin y Paxinos), utilizando un flujo constante de 0.1 μ L/min hasta completar 1.0 μ L por hemisferio. Inmediatamente después de la cirugía, recibieron ketoprofeno (5 mg/kg, s.c.) como analgesia y se monitorizaron durante al menos 14 días antes de iniciar la activación crónica de hM4Di mediante la administración del ligando sintético compuesto 21 (C21).

Activación quimiogénica de hM4Di y evaluación de la actividad locomotora

Tras el período de recuperación posquirúrgica (\geq 14 días), los ratones TH-Cre fueron sometidos a manipulación diaria durante 3-5 días para su habituación. Para evaluar el efecto de la activación quimiogénica, se administró por vía intraperitoneal (i.p.) el compuesto 21 (C-21; 1.0 mg/kg en solución salina estéril) o un volumen equivalente de solución salina como control, durante 5 días consecutivos. Inmediatamente después de cada inyección, los animales fueron colocados individualmente en cámaras de acrílico blanco (40×40×40 cm) donde se registró su actividad locomotora durante 60 minutos mediante un sistema de videograbación posicionada en el techo de la sala de medición conductual y posterior análisis con el software EthoVision® XT (v15.0) para cuantificar distancia recorrida, velocidad promedio y tiempo de inmovilidad. Finalizado el protocolo farmacológico, a las 24-48 horas de la última inyección los animales fueron sacrificados bajo anestesia profunda (isoflurano 5%) y mediante perfusión transcardíaca con paraformaldehído al 2-4% para inmunofluorescencia o decapitación para estudios de Western blot, según los requerimientos experimentales posteriores.

Perfusión transcardíaca

Para la obtención de cortes fijados de tejido cerebral, se realizó perfusión transcardíaca bajo anestesia con isoflurano. Mediante una aguja 21G 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 (Leica) a -20°C, y se obtuvieron cortes de las regiones de interés (núcleo accumbens, VTA, sustancia negra, 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.

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 conejo (1:1000, Merck #657012) o anti-D₂R hecho en conejo (1:500, 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: Cy3 anti-conejo (1:500, Jackson #711165152) para TH y Alexa Fluor 488 anti-conejo (1:500, Invitrogen #A-21206) para D₂R. Finalmente, tras tres lavados con PBS, los cortes se montaron en portaobjetos Superfrost Plus™ con medio antifade con DAPI (Abcam #ab104139) y se observaron primero en microscopio de epifluorescencia 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.

Western-Blot

Para la cuantificación de la expresión de proteínas D₂R y GAPDH en el núcleo accumbens (NAc), se utilizó la técnica de Western blot. Los tejidos fueron extraídos bajo condiciones de hielo seco y homogeneizados en buffer RIPA 1X suplementado con inhibidores de proteasas (50X) y fosfatasas (100X). La lisis se realizó mediante sonicación (3 ciclos de 5 segundos con intervalos en hielo), y posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 12.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -80°C.

La concentración de proteínas se determinó utilizando un fluorímetro Qubit (Thermo Fisher Scientific), según el protocolo del kit Qubit™ Protein Assay. Para cada muestra, se preparó un volumen equivalente a 30 µg de proteína total, mezclado con buffer de carga y desnaturalizado a 95°C por 5 minutos.

Las proteínas fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% (gel resolutivo) y 4% (gel concentrador) en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), y transferidas a membranas de nitrocelulosa mediante electrotransferencia húmeda (350 mA, 90 minutos, 4°C). La eficiencia de la transferencia se verificó con tinción reversible de rojo Ponceau.

Las membranas fueron bloqueadas durante 1 hora con leche descremada al 5% en T-TBS (TBS con 0,1% Tween-20) y posteriormente incubadas con anticuerpos primarios overnight a 4 °C: anti-D2R (1:1000, Merck #AB5084P) y anti-GAPDH (1:10000, Merck #MAB374). Luego de lavados con T-TBS, las membranas fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa de rábano (HRP). La detección de las bandas se realizó mediante quimioluminiscencia utilizando un sustrato ECL y un sistema de imagen digital (Omega Lum G). Las imágenes fueron adquiridas en modo quimioluminiscente con configuración de alta resolución. La cuantificación de la intensidad de las bandas se realizó utilizando el software ImageJ, y los niveles de D2R fueron normalizados contra GAPDH como control de carga.

RESULTADOS

Verificación de la expresión del receptor quimiogénico hM4Di en el VTA

Para evaluar el efecto de la inhibición crónica de la actividad dopaminérgica mesolímbica, primero fue necesario confirmar la expresión del receptor quimiogénico inhibitorio hM4Di en las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral (VTA). Como se muestra en la Figura 1, la inmunofluorescencia indirecta reveló una colocación entre la tirosina hidroxilasa (TH, marcador dopaminérgico) y la proteína fluorescente mCitrine, coexpresada con hM4Di. La señal amarilla resultante indica la correcta transfección del vector viral pAAV-hSyn-DIO-HA-hM4D(Gi)-IRES-mCitrine en neuronas dopaminérgicas del VTA, validando que la manipulación quimiogénica se llevó a cabo de manera específica en la población neuronal de interés.

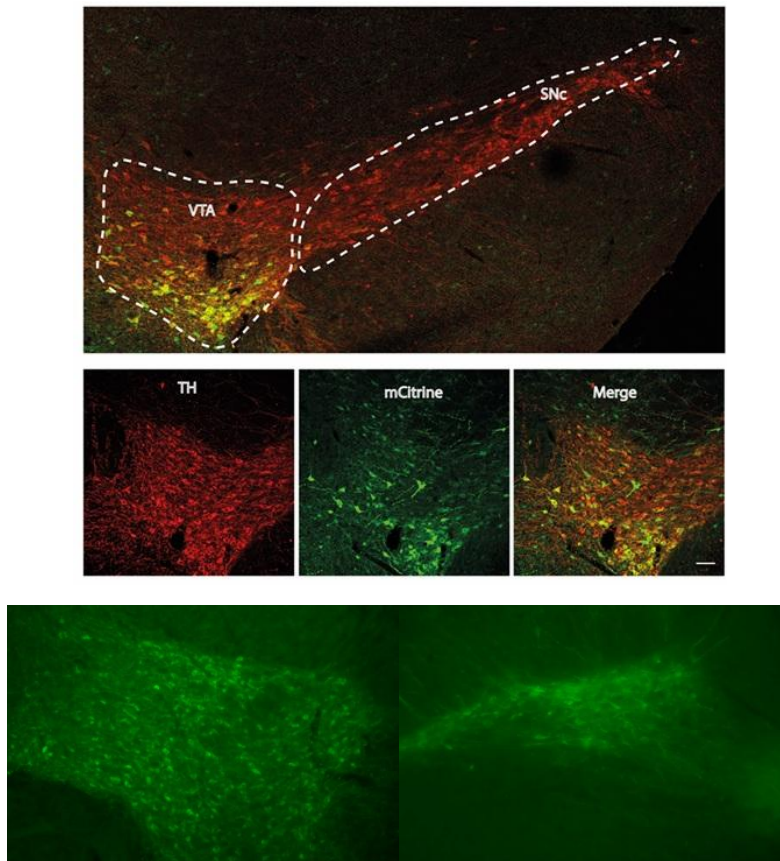


Figura 1: Imágenes de neuronas dopaminérgicas marcadas por inmunofluorescencia para α GFP (verde), α TH (rojo) y la combinación entre GFP y TH (verde, rojo y amarillo) del área tegmental ventral. En la imagen superior se muestra que el virus DREADD se expresó en las neuronas dopaminérgicas del VTA.

Efecto de la inhibición dopaminérgica sobre la actividad locomotora

Una vez confirmada la expresión del receptor quimiogénico, se evaluó el impacto de su activación crónica sobre la conducta locomotora. Para ello, se administró intraperitonealmente el agonista selectivo C21 durante cinco días consecutivos y se registró la actividad motora en una prueba de campo abierto. El análisis ANOVA de 2 vías no mostró efectos significativos inducidos por el tiempo ni el tipo de tratamiento. Como se muestra en la **Figura 2A**, no se observaron diferencias significativas en la distancia recorrida entre los grupos tratados con C21 y sus respectivos controles, independientemente de la presencia del receptor hM4Di.

Con el fin de focalizar el análisis en el impacto de la inhibición dopaminérgica, la **Figura 2B** muestra de forma aislada la actividad locomotora de los animales que expresaban hM4Di. Esta representación permite apreciar que, incluso bajo condiciones de activación de hM4Di inducida por C21 y, por ende, de inhibición crónica de la actividad dopaminérgica mesolímbica, la distancia recorrida no difirió significativamente respecto al grupo que posee hM4D pero que fue tratado con solución salina, lo que indica que la manipulación no alteró la locomoción horizontal.

Por otro lado, el tiempo que los animales pasaron en el centro o en la periferia de la arena (**Figura 2C**) fue similar entre los grupos, evidenciando la ausencia de cambios en la exploración espacial o en los niveles de ansiedad asociados al tratamiento. Estos resultados indican que la inhibición crónica de la actividad dopaminérgica mesolímbica no fue suficiente para modificar la actividad locomotora horizontal ni los comportamientos tipo ansiosos en este paradigma.

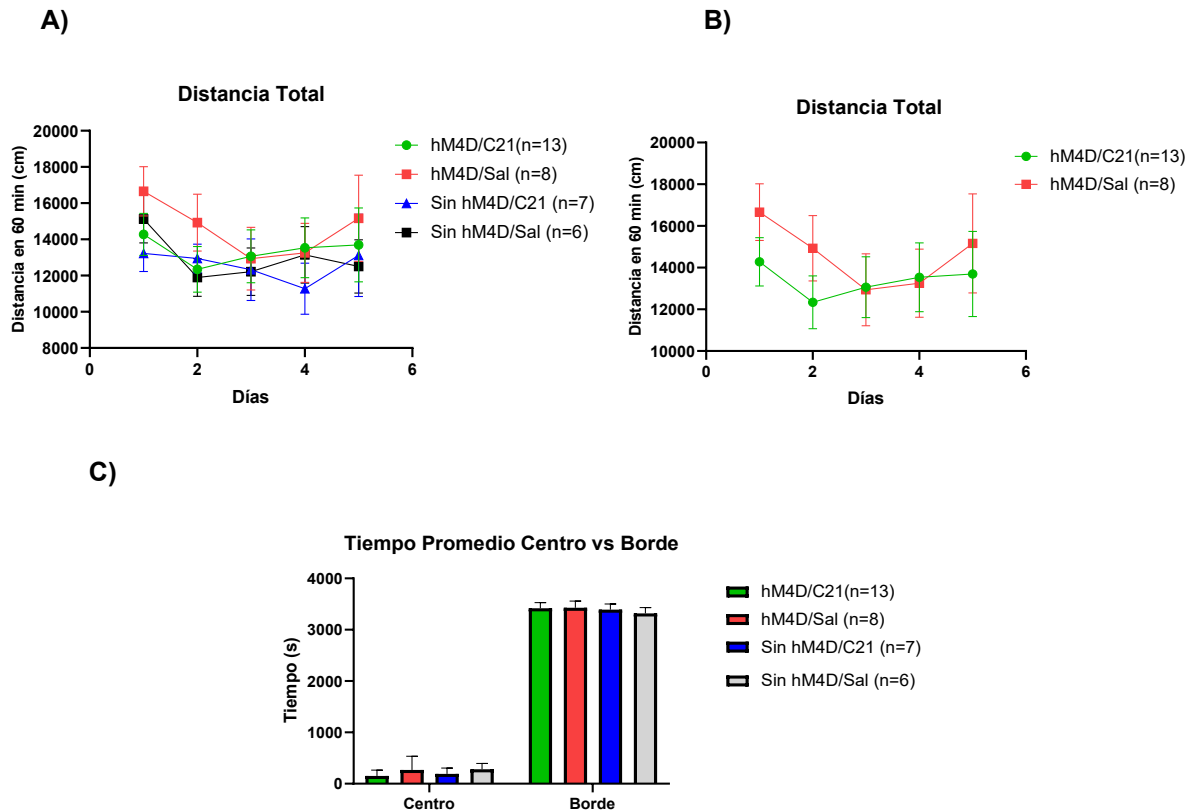


Figura 2: A) Distancia recorrida (cm) durante 60 minutos en 5 días de evaluación para cuatro grupos experimentales: hM4Di + C21 (verde, n=13), hM4Di + Salina (rojo, n=8), sin hM4Di + C21 (azul, n=7) y sin hM4Di + Salina (negro, n=5). El grupo hM4Di + Salina presentó valores más altos en el primer día, pero posteriormente todos los grupos mostraron valores similares a lo largo de las sesiones. No se observaron diferencias consistentes entre los grupos tratados con C21 y sus respectivos controles. Los datos se presentan como media \pm SEM. B) Distancia recorrida (cm) durante 60 minutos en 5 días de evaluación para ratones con expresión de hM4Di tratados con C21 (verde, n=13) o solución salina (rojo, n=8). C) Tiempo promedio (\pm SEM) que los animales pasaron en el centro y en el borde durante la prueba de campo abierto. En todos los grupos, el tiempo en el borde fue significativamente mayor que en el centro, lo que refleja una preferencia por la periferia del campo abierto. No se observaron diferencias evidentes entre grupos en la distribución del tiempo entre centro y borde.

Validación funcional del DREADD mediante registros electrofisiológicos

Dada la falta de efectos locomotores presentados por los animales que expresaban hM4D y tratados con C21 y con el fin de corroborar que el receptor hM4Di expresado en el VTA era funcional y capaz de modular la excitabilidad neuronal, se realizaron registros electrofisiológicos en corte mediante la técnica de patch-clamp en configuración whole-cell. Los registros fueron realizados en cortes coronales de animales que habían sido tratados con C21. Las neuronas dopaminérgicas hM4Di-positivas fueron identificadas por la expresión de mCitrine y se rellenaron con Alexa 594 para su visualización. Como se observa en la **Figura 3**, una confirmación adicional de la identidad dopaminérgica es la presencia de actividad eléctrica espontánea o tónica en las neuronas registradas. Por otro lado, la inyección de corriente (25pA) indujo un aumento en la frecuencia de disparo, posiblemente fásico, sin acomodación de los potenciales de acción. Importantemente, la aplicación de clozapina-N-óxido (CNO), agonista DREADD, indujo una marcada reducción en la frecuencia de potenciales de acción espontáneos e inducidos eléctricamente, confirmando que el receptor hM4Di es funcional y capaz de inhibir la actividad neuronal en respuesta a la activación farmacológica. Además, los datos indican que la función del receptor se mantiene incluso luego de 5 días de agonismo.

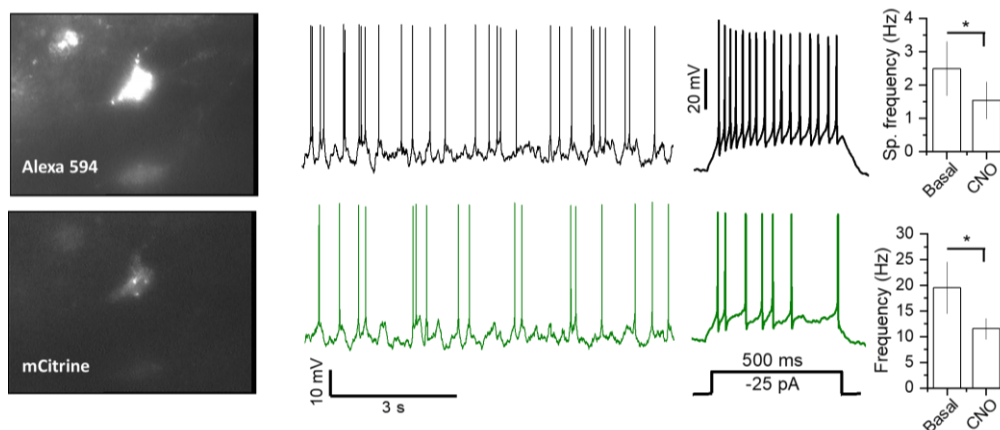
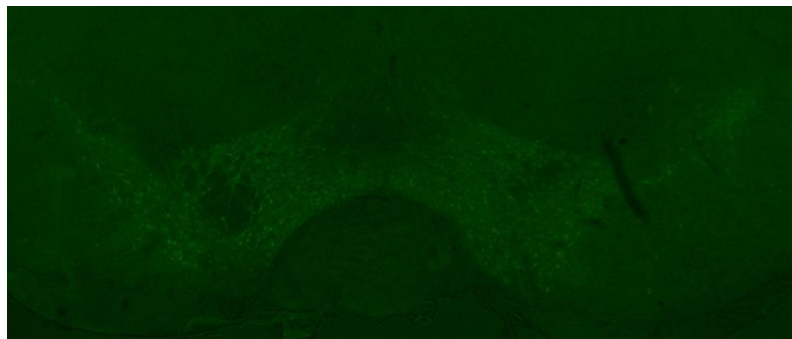


Figura 3: *Inhibición de neuronas dopaminérgicas hM4Di-positivas por aplicación de CNO. A la izquierda, imágenes de fluorescencia que muestran una neurona dopaminérgica del VTA registrada rellena con Alexa 594 (arriba) e identificada por la expresión de mCitrine (abajo),*

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.

Inmunofluorescencia de D2R (sin detección específica)

Inicialmente se evaluó la presencia y distribución del receptor dopaminérgico D2R en el núcleo accumbens mediante inmunofluorescencia indirecta, con el objetivo de analizar su posible colocalización con las neuronas dopaminérgicas marcadas por la expresión del DREADD Cre-dependiente (reportero mCitrine) en ratones TH-Cre. La señal fluorescente verde, correspondiente a mCitrine, mostró la localización esperada en las neuronas transducidas, confirmando la expresión del constructo. En contraste, la señal del marcador anti-D2R, detectada mediante fluoróforo rojo, presentó una fluorescencia difusa e inespecífica, visible como una mancha intensa sin delimitación celular clara y sin indicios de colocalización con mCitrine. Se probaron ajustes en concentración de anticuerpo, tiempos de incubación y condiciones de fijación/permeabilización, sin mejorar la especificidad de la señal roja. Dado lo anterior, se optó por complementar y cuantificar la expresión de D2R mediante Western blot, para detectar los niveles totales (incluyendo isoformas y estados de glicosilación) en tejido del NAc.



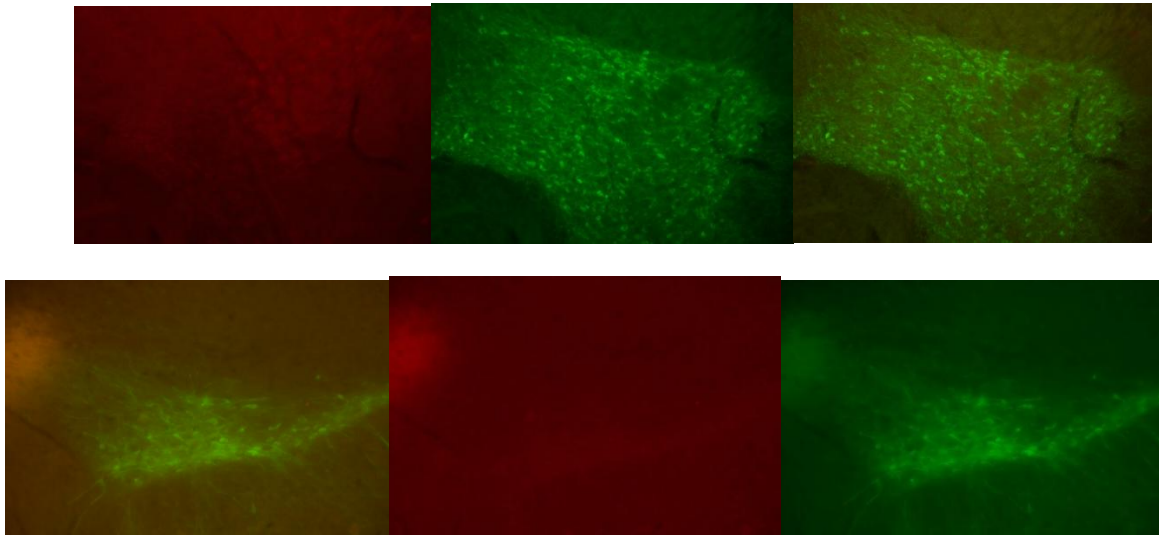


Figura 4: Inmunofluorescencia contra D₂R realizada en el mesencéfalo de ratón. La fluorescencia verde corresponde a la señal del marcador TH, que identifica las neuronas dopaminérgicas. La tinción para D₂R (fluoróforo rojo) mostró una señal difusa e inespecífica, observada como una marca intensa sin delimitación celular clara, sin evidencia de colocalización con TH.

Niveles de receptores dopaminérgicos D₂ en el núcleo accumbens

Finalmente, se analizó si la inhibición crónica de la actividad dopaminérgica inducía cambios en los niveles de proteína de los D₂R en el núcleo accumbens. Para ello, se cuantificaron mediante Western blot las formas glicosiladas (~70 kDa) y la isoforma larga D₂L (~45–50 kDa) del receptor, normalizando contra GAPDH. Como se muestra en la Figura 4, no se detectaron diferencias significativas en los niveles de ninguna de las formas de D₂R entre los distintos grupos experimentales (sin DREADD/Salina, sin DREADD/C21, DREADD/Salina y DREADD/C21).

La Figura 5 muestra un ejemplo representativo de las membranas obtenidas, en las que las bandas correspondientes a D₂R glicosilado y D₂L/D₂S se observaron en los rangos de peso molecular esperados. Estos resultados sugieren que la inhibición sostenida por 5 días de la actividad dopaminérgica mesolímbica no indujo una regulación detectable de la expresión total de D₂R en el NAc ni al alza ni a la baja. Sugiriendo que la sola disminución de los niveles de

dopamina en el NAc no es suficiente para producir cambios a nivel proteico de sus receptores postsinápticos.

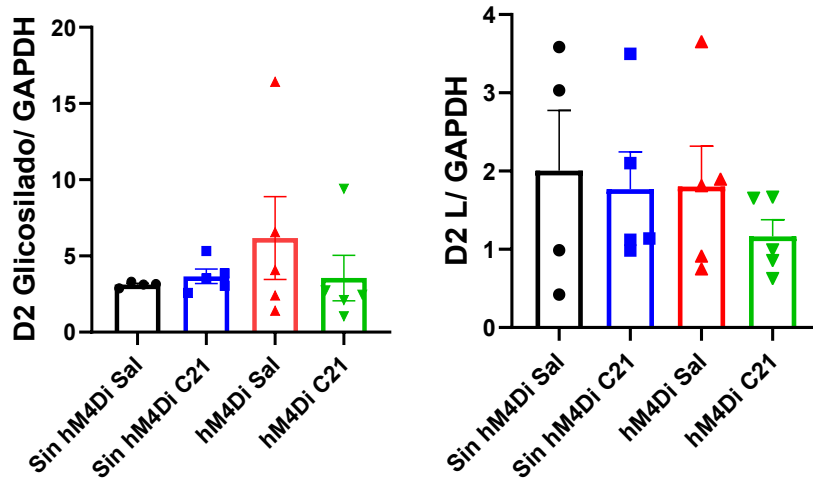


Figura 5: *Expresión relativa de los receptores dopaminérgicos tipo D₂ (D₂R) en sus formas glicosilada (izquierda) y en la isoforma larga (D₂L, derecha), normalizada contra GAPDH (media ± SEM). Se evaluaron cuatro grupos experimentales: sin hM4Di/Sal, sin hM4Di/C21, hM4Di/Sal y hM4Di/C21. Cada punto representa un animal individual. No se observaron diferencias evidentes entre grupos para ninguna de las dos formas de D₂R.*

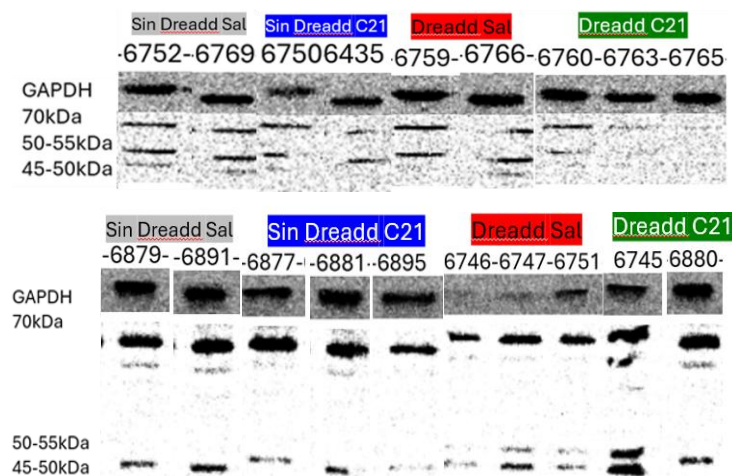


Figura 6: Western blot para GAPDH, receptor dopaminérgico tipo D_2 (D_2R) glicosilado y la isoforma larga de D_2 (D_2L), así como la isoforma corta (D_2S), en muestras de los diferentes grupos experimentales. Cada carril corresponde a un animal individual identificado por su código (parte superior de cada carril). El control de carga GAPDH se muestra en la parte superior de cada membrana. Las bandas de D_2R glicosilado se observan en el rango de ~70 kDa, mientras que las bandas correspondientes a D_2L/D_2S se detectan en el rango de 45–50 kDa. La tabla adyacente indica la asignación de cada muestra a los grupos experimentales: Sin DREADD.C21, Sin DREADD.Sal, DREADD.Sal y DREADD.C21. N = 19 animales.

Discusión

En esta tesis se evaluó si la inhibición crónica de las neuronas dopaminérgicas mesolímbicas mediante quimiogenética inducía cambios en los niveles proteicos de D₂R en el núcleo accumbens (NAc), y si esta manipulación era suficiente para alterar la actividad locomotora. A pesar de que la manipulación apuntaba a inducir un estado de hipodopaminergia funcional, no se observaron diferencias significativas en los parámetros de actividad locomotora entre los grupos tratados con C21 o con solución salina (Figura 2) ni en los niveles de D₂R (Figura 5).

Estos resultados contrastan con modelos farmacológicos como la sensibilización por quinpirol (QNP) o la depleción neurotóxica con 6-OHDA (I Creese et al., 1977), en los que se han descrito cambios robustos tanto a nivel conductual como molecular (Szechtman et al., 1998; Escobar et al., 2015). Sin embargo, los presentes hallazgos se alinean con otros estudios que han mostrado que la inhibición parcial de la actividad dopaminérgica mediante hM4Di no siempre alcanza un umbral suficiente para inducir fenotipos claros (Jendryka et al., 2019; Tran et al., 2020).

En conjunto, los resultados de esta tesis sugieren que la inhibición crónica de la actividad dopaminérgica mesolímbica mediante DREADDs no es suficiente, por sí sola, para inducir alteraciones detectables en la expresión de D₂R ni en la actividad locomotora horizontal en ratones. Esto podría deberse a que el grado de hipodopaminergia alcanzado no supera el umbral necesario para gatillar una respuesta conductual o molecular observable, o bien a que se requieren factores adicionales para desestabilizar el equilibrio dopaminérgico. En este sentido, en modelo de administración repetida de QNP en ratas induce sensibilización locomotora, una posibilidad es que la combinación de la inhibición dopaminérgica presináptica junto con la activación de D₂R postsinápticos en el NAc podría generar un efecto sinérgico que potencie la disfunción del sistema y facilite la aparición de un fenotipo comportamental que gatille de forma aguda una disminución de la actividad locomotora y luego un aumento sostenido o sensibilización locomotora (Perreault et al., 2006; Szechtman et al., 1998). Este tipo de enfoque ha sido explorado en estudios con ratas, donde la sensibilización por QNP induce alteraciones robustas en la conducta y en la neurotransmisión del NAc (Escobar et al., 2015; Szechtman et al., 1998). Cabe señalar que la manipulación realizada en este estudio fue anatómica y funcionalmente más específica que la inducida por modelos farmacológicos

como el de QNP. Mientras que QNP activa receptores D_2 y D_3 en múltiples regiones del sistema nervioso central (incluyendo el estriado dorsal y estructuras no dopaminérgicas), la estrategia quimiogénica utilizada aquí se dirigió exclusivamente a las neuronas dopaminérgicas del VTA, responsables de modular el NAc, utilizando 1ul del virus con un título de 10^{12-13} partículas virales por ul, alcanzándose un porcentaje de infección viral en las neuronas de aproximadamente el 55% (datos no mostrados). Esta diferencia en especificidad podría explicar por qué no se replicaron los efectos conductuales ni los cambios moleculares descritos con QNP. Por otro lado, sugieren que probablemente modificaciones en la actividad locomotora crónica requieran de modulaciones en varias áreas, VTA y SNc y sus áreas blanco, de forma simultánea o alternativamente, que se requiera un mayor número de neuronas del VTA que expresen hM4D y por tanto una mayor tasa de infección. Además, al modular la excitabilidad presináptica de forma indirecta (vía inhibición neuronal), el sistema DREADD puede inducir adaptaciones más sutiles que aquellas generadas por un agonista dopaminérgico exógeno que actúa directamente sobre los D_2R postsinápticos.

Grado de hipodopaminergia y umbral de cambio en D_2R

Debido a esto, una primera interpretación es que el grado de hipodopaminergia alcanzado mediante la inhibición quimiogénica crónica no fue suficiente para desencadenar los mecanismos de plasticidad adaptativa que resultan en una regulación al alza (upregulation) de los D_2R . Esto significa que, antes de recurrir a un cambio tan drástico como aumentar el número total de receptores, el sistema activa una serie de mecanismos compensatorios más sutiles y eficientes. Estudios clásicos que utilizan lesiones neurotóxicas con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) han demostrado que una depleción dopaminérgica severa (>90%) es necesaria para inducir un aumento significativo en la densidad de receptores D_2 , un fenómeno conocido como supersensibilidad por denervación (I Creese et al., 1977); (Neve et al., 2004). Es posible que la inhibición mediada por hM4Di, aunque efectiva para reducir la excitabilidad neuronal, genere una reducción de dopamina tónica y fásica más sutil y fisiológicamente contenida que no alcanza el umbral crítico para inducir cambios en la expresión génica o proteica de los receptores. En su lugar, frente a una hipodopaminergia moderada, el sistema dopaminérgico tiende a priorizar mecanismos de compensación más sutiles y eficientes que no requieren aumentar directamente el número total de receptores. Entre estas estrategias se incluye la

reducción en la actividad del transportador de dopamina (DAT), lo cual prolonga la permanencia de dopamina en el espacio sináptico y potencia su efecto postsináptico. También se ha descrito un aumento en la síntesis y liberación de dopamina por parte de las neuronas dopaminérgicas remanentes como un intento de restaurar el tono dopaminérgico general (Greenbaum et al., 2013). Finalmente, pueden ocurrir modificaciones funcionales de los receptores existentes, como cambios en su sensibilidad al ligando, fosforilación, o acoplamiento a proteínas G, que mejoran la eficiencia de la señalización sin necesidad de alterar su expresión total detectada por Western blot (Beaulieu et al., 2014).

Aunque la activación crónica de hM4Di mediante C21 debiera suprimir la actividad de las neuronas dopaminérgicas del VTA y, por ende, reducir la liberación de dopamina en el NAc, esta supresión no se tradujo en cambios detectables por Western blot en la expresión de D₂R. Es posible que la inhibición inducida por C21 no haya alcanzado un umbral de hipodopaminergia suficiente para desencadenar mecanismos compensatorios a nivel de los receptores, o que los cambios ocurran de forma más sutil, a nivel de regulación funcional (por ejemplo, fosforilación, internalización) y no de expresión total de la proteína. Además, el Western blot no permite distinguir entre subpoblaciones neuronales, por lo que los cambios específicos en iMSN o en D₂ presinápticos localizados en terminales gabaérgicos o glutamatérgicos podrían haberse diluido al analizar el tejido del NAc en su conjunto.

Por otro lado, la ausencia de cambios en la locomoción espontánea sugiere que la hipodopaminergia inducida artificialmente, por sí sola, no genera un fenotipo conductual alterado en este paradigma. Esto contrasta con estudios en ratas donde el déficit dopaminérgico (ya sea inducido farmacológicamente con QNP o por daño neurotóxico) se ha asociado a una mayor sensibilidad a estímulos dopaminérgicos y a la aparición de conductas repetitivas (Koeltzow et al., 2003);(Ávila et al., 2011). Una explicación a esto es que los ratones presentan diferencias especies-específicas en la regulación dopaminérgica del comportamiento, como lo han sugerido en su evaluación comparativa de modelos TOC en ratones y ratas (Asaoka et al., 2019);(Szechtman et al., 1998);(Escobar et al., 2015).

Limitaciones metodológicas

Una limitación relevante es que no se verificó directamente la disminución de dopamina extracelular mediante técnicas como microdiálisis in vivo o voltametría cíclica de barrido rápido (FSCV). Esto impide confirmar con certeza el grado de hipodopaminergia alcanzado. Asimismo, el análisis mediante Western blot sobre tejido total del NAc no permite detectar cambios restringidos a subpoblaciones específicas de neuronas (iMSN vs. dMSN, autorreceptores presinápticos vs. receptores postsinápticos).

Además, aunque inicialmente se planificó evaluar la localización específica de D₂R en el NAc mediante inmunofluorescencia (marcando D₂R, neuronas TH y DREADD), esta aproximación no pudo concretarse debido a problemas de especificidad y calidad de señal con el anticuerpo anti- D₂R utilizado. A pesar de realizar múltiples intentos con distintas condiciones de incubación y detección, no se obtuvo una señal fiable que permitiera el análisis de colocalización. Este inconveniente llevó a priorizar el análisis de niveles proteicos totales mediante Western blot, técnica que, si bien no permite discriminar entre subpoblaciones neuronales, sí ofreció una cuantificación robusta y reproducible de la expresión global de D₂R en el NAc.

Finalmente, es relevante destacar que este estudio fue realizado en ratones, una especie menos explorada en modelos TOC comparado con ratas, pero con alta versatilidad genética y creciente importancia en neurociencia conductual. La implementación de aproximaciones quimiogénicas en ratones abre la puerta a combinaciones futuras con modelos transgénicos y análisis específicos de subtipos neuronales, permitiendo abordar con mayor precisión preguntas sobre los circuitos celulares implicados en la compulsividad.

Proyecciones y futuras direcciones

Los resultados de este estudio, aunque negativos en términos de cambios detectables, ofrecen información valiosa sobre los alcances y límites de la manipulación quimiogénica. Futuras investigaciones podrían:

- Medir directamente la liberación de dopamina en el NAc durante y después de la activación de hM4Di (microdiálisis, FSCV).

- Combinar la inhibición dopaminérgica con un fármaco como quinpirol.
- Analizar cambios a nivel de subpoblaciones neuronales mediante inmunofluorescencia cuantitativa o separación de fracciones sinápticas.
- Explorar la modulación de otros sistemas, como D₁R, receptores colinérgicos y glutamatérgicos, que podrían estar modulando la respuesta compensatoria.

Conclusión

En conjunto, los resultados sugieren que la inhibición selectiva y crónica de neuronas dopaminérgicas del VTA mediante una única inyección de DREADDs no es suficiente para inducir cambios detectables en locomoción basal ni en la expresión global de D₂R en el NAc. La ausencia de efectos podría deberse a un grado de hipodopaminergia insuficiente, a que la eficiencia de la transducción viral ocurrió en un número insuficiente de neuronas del VTA para elicitar un cambio comportamental, a mecanismos compensatorios eficientes o a la necesidad de interacciones con otros sistemas neuroquímicos. Pese a no encontrar cambios significativos, este trabajo contribuye a delinear los límites de la manipulación quimiogenética en el estudio de la dopamina y abre la posibilidad a experimentos futuros que integren enfoques complementarios para profundizar en los mecanismos neurobiológicos de la compulsividad.

Referencias

- Alexander, G. E., & Crutcher, M. D. (1990). Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends in Neurosciences*, 13(7), 266–271. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0166-2236\(90\)90107-L](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0166-2236(90)90107-L)
- Asaoka, N., Nishitani, N., Kinoshita, H., Nagai, Y., Hatakama, H., Nagayasu, K., Shirakawa, H., Nakagawa, T., & Kaneko, S. (2019). An adenosine A_{2A} receptor antagonist improves multiple symptoms of repeated quinpirole-induced psychosis. *ENeuro*, 6(1). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0366-18.2019>
- Association, A. P. (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (Fifth Edition). American Psychiatric Association. <https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596>
- Ávila, A., Cardona, X., Martín-Baranera, M., Bello, J., & Sastre, F. (2011). Impulsive and compulsive behaviors in Parkinson's disease: A one-year follow-up study. *Journal of the Neurological Sciences*, 310(1–2), 197–201. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2011.05.044>
- Bariselli, S., Fobbs, W. C., Creed, M. C., & Kravitz, A. V. (2019). A competitive model for striatal action selection. In *Brain Research* (Vol. 1713, pp. 70–79). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.10.009>
- Beaulieu, J.-M., Espinoza, S., & Gainetdinov, R. R. (2014). *NC-IUPHAR REVIEW*. <https://doi.org/10.1111/bph.12445/abstract>
- Bertran-Gonzalez, J., Bosch, C., Maroteaux, M., Matamales, M., Hervé, D., Valjent, E., & Girault, J. A. (2008). Opposing patterns of signaling activation in dopamine D1 and D2 receptor-expressing striatal neurons in response to cocaine and haloperidol. *Journal of Neuroscience*, 28(22), 5671–5685. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1039-08.2008>
- Bokor, G., & Anderson, P. D. (2014). Obsessive–Compulsive Disorder. *Journal of Pharmacy Practice*, 27(2), 116–130. <https://doi.org/10.1177/0897190014521996>
- Calabresi, P., Picconi, B., Tozzi, A., Ghiglieri, V., & Di Filippo, M. (2014). Direct and indirect pathways of basal ganglia: A critical reappraisal. In *Nature Neuroscience* (Vol. 17, Issue 8, pp. 1022–1030). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nn.3743>
- Centonze, D., Usiello, A., Gubellini, P., Pisani, A., Borrelli, E., Bernardi, G., & Calabresi, P. (2002a). Dopamine D2 Receptor-Mediated Inhibition of Dopaminergic Neurons in Mice Lacking D2L Receptors. In *Neuropsychopharmacology* (Vol. 27, Issue 5). www.acnp.org/citations/Npp
- Centonze, D., Usiello, A., Gubellini, P., Pisani, A., Borrelli, E., Bernardi, G., & Calabresi, P. (2002b). Dopamine D2 Receptor-Mediated Inhibition of Dopaminergic Neurons in Mice Lacking D2L Receptors. *Neuropsychopharmacology*, 27(5), 723–726. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(02\)00367-6](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(02)00367-6)

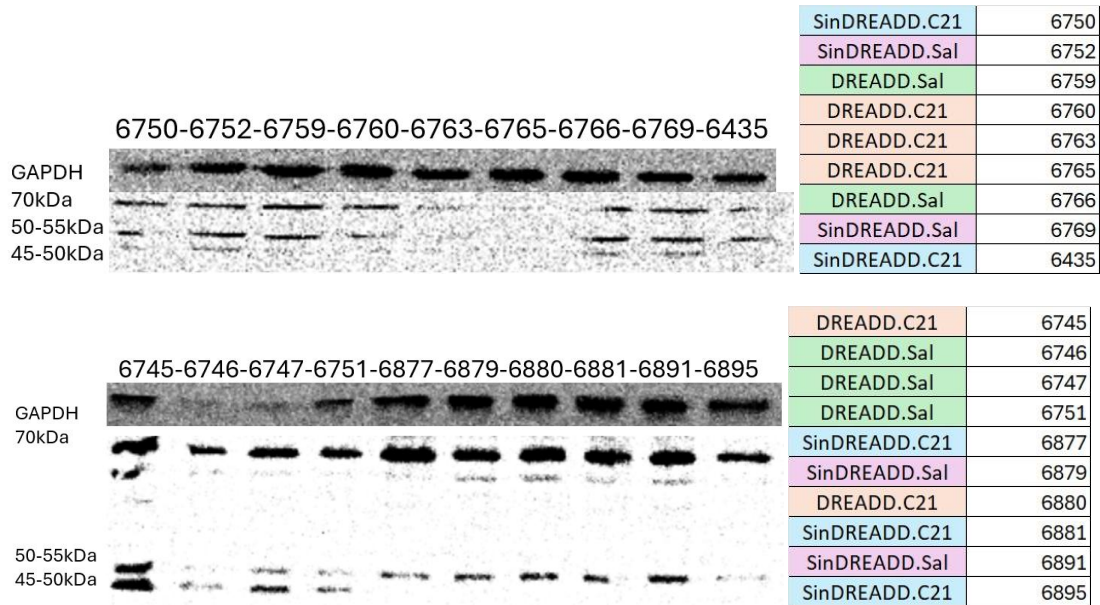
- Chen, R., Ferris, M. J., & Wang, S. (2020). Dopamine D2 autoreceptor interactome: Targeting the receptor complex as a strategy for treatment of substance use disorder. *Pharmacology & Therapeutics*, 213, 107583. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107583>
- Cho, D. I., Min, C., Jung, K. S., Cheong, S. Y., Zheng, M., Cheong, S. J., Oak, M. H., Cheong, J. H., Lee, B. K., & Kim, K. M. (2012). The N-terminal region of the dopamine D2 receptor, a rhodopsin-like GPCR, regulates correct integration into the plasma membrane and endocytic routes. *British Journal of Pharmacology*, 166(2), 659–675. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01787.x>
- Culver, K. E., Szechtman, H., & Levant, B. (2008). Altered dopamine D2-like receptor binding in rats with behavioral sensitization to quinpirole: effects of pre-treatment with Ro 41-1049. *European Journal of Pharmacology*, 592(1–3), 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.06.101>
- de Haas, Ria, Nijdam, Annelies, Westra, Tjalke A, Kas, Martien J H, & Westenberg, Herman G M. (2010). Behavioral pattern analysis and dopamine release in quinpirole-induced repetitive behavior in rats. *Journal of Psychopharmacology*, 25(12), 1712–1719. <https://doi.org/10.1177/0269881110389093>
- Deng, Y.-P., Lei, W.-L., & Reiner, A. (2006). Differential perikaryal localization in rats of D1 and D2 dopamine receptors on striatal projection neuron types identified by retrograde labeling. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 32(2), 101–116. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2006.07.001>
- Denys, D., Van Der Wee, N., Janssen, J., De Geus, F., & Westenberg, H. G. M. (2004a). Low level of dopaminergic D2 receptor binding in obsessive-compulsive disorder. *Biological Psychiatry*, 55(10), 1041–1045. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.01.023>
- Denys, D., Van Der Wee, N., Janssen, J., De Geus, F., & Westenberg, H. G. M. (2004b). Low level of dopaminergic D2 receptor binding in obsessive-compulsive disorder. *Biological Psychiatry*, 55(10), 1041–1045. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.01.023>
- Escobar, A. P., Cornejo, F. A., Olivares-Costa, M., González, M., Fuentealba, J. A., Gysling, K., España, R. A., & Andrés, M. E. (2015). Reduced dopamine and glutamate neurotransmission in the nucleus accumbens of quinpirole-sensitized rats hints at inhibitory D2 autoreceptor function. *Journal of Neurochemistry*, 134(6), 1081–1090. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jnc.13209>
- Fishburn, C. S., Elazar, Z., & Fuchs, S. (1995). Differential Glycosylation and Intracellular Trafficking for the Long and Short Isoforms of the D2 Dopamine Receptor*. In *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* (Vol. 270, Issue 50).
- Ford, C. P. (2014). The role of D2-autoreceptors in regulating dopamine neuron activity and transmission. In *Neuroscience* (Vol. 282, pp. 13–22). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.01.025>

- Foster, J. D., & Vaughan, R. A. (2017). Phosphorylation mechanisms in dopamine transporter regulation. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 83–84, 10–18.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2016.10.004>
- Gainetdinov, R. R., Premont, R. T., Bohn, L. M., Lefkowitz, R. J., & Caron, M. G. (2004). Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. In *Annual Review of Neuroscience* (Vol. 27, pp. 107–144).
<https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144206>
- Gerfen, C. R., & Surmeier, D. J. (2011). Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annual Review of Neuroscience*, 34, 441–466.
<https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113641>
- Greenbaum, L., Lorberboym, M., Melamed, E., Rigbi, A., Barhum, Y., Kohn, Y., Khlebtovsky, A., Lerer, B., & Djaldetti, R. (2013). Perspective: Identification of genetic variants associated with dopaminergic compensatory mechanisms in early Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroscience*, 7 APR. <https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00052>
- Hedreen, J. C., & DeLong, M. R. (1991). Organization of striatopallidal, striatonigral, and nigrostriatal projections in the macaque. *Journal of Comparative Neurology*, 304(4), 569–595. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cne.903040406>
- Hiebert, N. M., Lawrence, M. R., Ganjavi, H., Watling, M., Owen, A. M., Seergobin, K. N., & MacDonald, P. A. (2020). Striatum-Mediated Deficits in Stimulus-Response Learning and Decision-Making in OCD. *Frontiers in Psychiatry*, 11.
<https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.00013>
- Hirschtritt, M. E., Bloch, M. H., & Mathews, C. A. (2017). Obsessive-Compulsive Disorder: Advances in Diagnosis and Treatment. *JAMA*, 317(13), 1358–1367.
<https://doi.org/10.1001/jama.2017.2200>
- I Creese, D R Burt, & S H Snyder. (1977). Dopamine Receptor Binding Enhancement Accompanies Lesion-Induced Behavioral Supersensitivity. In *Ann. Mo. Bot. Gard* (Vol. 110).
- Jalal, B., Chamberlain, S. R., & Sahakian, B. J. (2023). Obsessive-compulsive disorder: Etiology, neuropathology, and cognitive dysfunction. In *Brain and Behavior* (Vol. 13, Issue 6). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/brb3.3000>
- Jendryka, M., Palchadhuri, M., Ursu, D., van der Veen, B., Liss, B., Kätzel, D., Nissen, W., & Pekcec, A. (2019). Pharmacokinetic and pharmacodynamic actions of clozapine-N-oxide, clozapine, and compound 21 in DREADD-based chemogenetics in mice. *Scientific Reports*, 9(1), 4522. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41088-2>
- Kim, D. S., Szczyepka, M. S., & Palmiter, R. D. (2000). *Dopamine-Deficient Mice Are Hypersensitive to Dopamine Receptor Agonists.*

- Klanker, M., Feenstra, M., & Denys, D. (2013). Dopaminergic control of cognitive flexibility in humans and animals. *Frontiers in Neuroscience*, 7 NOV. <https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00201>
- Koeltzow, T. E., Austin, J. D., & Vezina, P. (2003). Behavioral sensitization to quinpirole is not associated with increased nucleus accumbens dopamine overflow. *Neuropharmacology*, 44(1), 102–110. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(02\)00328-3](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(02)00328-3)
- Menzies, L., Chamberlain, S. R., Laird, A. R., Thelen, S. M., Sahakian, B. J., & Bullmore, E. T. (2008). Integrating evidence from neuroimaging and neuropsychological studies of obsessive-compulsive disorder: The orbitofronto-striatal model revisited. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 32, Issue 3, pp. 525–549). <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2007.09.005>
- Milad, M. R., & Rauch, S. L. (2012). Obsessive-compulsive disorder: Beyond segregated cortico-striatal pathways. In *Trends in Cognitive Sciences* (Vol. 16, Issue 1, pp. 43–51). <https://doi.org/10.1016/j.tics.2011.11.003>
- Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M., & Caron, M. G. (1998). Dopamine Receptors: From Structure to Function. In *PHYSIOLOGICAL REVIEWS* (Vol. 78, Issue 1).
- Moore, T. J., Glenmullen, J., & Mattison, D. R. (2014). Reports of Pathological Gambling, Hypersexuality, and Compulsive Shopping Associated With Dopamine Receptor Agonist Drugs. *JAMA Internal Medicine*, 174(12), 1930–1933. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2014.5262>
- Neve, K. A., Seamans, J. K., & Trantham-Davidson, H. (2004). Dopamine Receptor Signaling. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*, 24(3), 165–205. <https://doi.org/10.1081/lrst-200029981>
- Olver, J. S., O'Keefe, G., Jones, G. R., Burrows, G. D., Tochon-Danguy, H. J., Ackermann, U., Scott, A., & Norman, T. R. (2009). Dopamine D1 receptor binding in the striatum of patients with obsessive-compulsive disorder. *Journal of Affective Disorders*, 114(1–3), 321–326. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2008.06.020>
- Perreault, M. L., Graham, D., Bisnaire, L., Simms, J., Hayton, S., & Szechtman, H. (2006). Kappa-opioid agonist U69593 potentiates locomotor sensitization to the D2/D3 agonist quinpirole: Pre- and postsynaptic mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, 31(9), 1967–1981. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300938>
- Pittenger, C., & Bloch, M. H. (2014). *Pharmacological treatment of obsessive-compulsive disorder*. *The Psychiatric clinics of North America*, 37(3), 375–391. <https://doi.org/10.1016/j.psc.2014.05.006>. (n.d.).
- Seiler, J. L., Cosme, C. V., Sherathiya, V. N., Schaid, M. D., Bianco, J. M., Bridgemohan, A. S., & Lerner, T. N. (2022). Dopamine signaling in the dorsomedial striatum promotes

- compulsive behavior. *Current Biology*, 32(5), 1175-1188.e5.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.01.055>
- Stuchlik, A., Radostová, D., Hatalova, H., Vales, K., Nekovarova, T., Koprivova, J., Svoboda, J., & Horacek, J. (2016). Validity of quinpirole sensitization rat model of OCD: Linking evidence from animal and clinical studies. In *Frontiers in Behavioral Neuroscience* (Vol. 10, Issue OCT). Frontiers Research Foundation.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2016.00209>
- Szechtman, H., Eckert, M. J., Tse, W. S., Boersma, J. T., Bonura, C. A., McClelland, J. Z., Culver, K. E., & Eilam, D. (2001). Compulsive checking behavior of quinpirole-sensitized rats as an animal model of Obsessive-Compulsive Disorder(OCD): form and control. In *BMC Neuroscience* (Vol. 2, Issue 4). <http://www.biomedcentral.com/1471-2202/2/4>
- Szechtman, H., Sulis, W., & Eilam, D. (1998). Quinpirole Induces Compulsive Checking Behavior in Rats: A Potential Animal Model of Obsessive-Compulsive Disorder (OCD). In *Behavioral Neuroscience* (Vol. 112, Issue 6).
- Tastevin, M., Spatola, G., Régis, J., Lançon, C., & Richieri, R. (2019). Deep brain stimulation in the treatment of obsessive-compulsive disorder: Current perspectives. In *Neuropsychiatric Disease and Treatment* (Vol. 15, pp. 1259–1272). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/NDT.S178207>
- Tran, F. H., Spears, S. L., Ahn, K. J., Eisch, A. J., & Yun, S. (2020). Does chronic systemic injection of the DREADD agonists clozapine-N-oxide or Compound 21 change behavior relevant to locomotion, exploration, anxiety, and depression in male non-DREADD-expressing mice? *Neuroscience Letters*, 739, 135432.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135432>
- Tritsch, N. X., & Sabatini, B. L. (2012). Dopaminergic Modulation of Synaptic Transmission in Cortex and Striatum. *Neuron*, 76(1), 33–50. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.023>
- Usiello, A., Baik, J.H., R.-P. F. et al. (2000). Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature*, 408, 199–203.
- Usiello, A., Baik, J.-H., Rougé-Pont, F., Picetti, R., Dierich, A., LeMeur, M., Piazza, P. V., & Borrelli, E. (2000). Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature*, 408(6809), 199–203. <https://doi.org/10.1038/35041572>
- Vlasov, K., Van Dort, C. J., & Solt, K. (2018). Chapter Eleven - Optogenetics and Chemogenetics. In R. G. Eckenhoff & I. J. Dmochowski (Eds.), *Methods in Enzymology* (Vol. 603, pp. 181–196). Academic Press.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.mie.2018.01.022>

Anexo



Anexo 1: Imagen original de los Western blot utilizados para el análisis de D₂R en el NAc.

En la Figura presentada a continuación se muestran las imágenes originales del Western blot obtenidas para la detección del receptor dopaminérgico D₂R y la proteína de referencia (GAPDH) en el núcleo accumbens. Estas imágenes corresponden a las membranas completas antes de su recorte y reorganización para la presentación en la sección de Resultados. Se incluyen con el propósito de garantizar la transparencia en el procesamiento de las figuras y la integridad de los datos experimentales