

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

Participación del complejo CDK5/p35 en el mecanismo
celular del Trastorno por Déficit de Atención con
Hiperactividad

por

Biol. Favio Krapacher

Directora: Dra. María Gabriela Paglini.

Lugar de trabajo: Instituto de Investigación Médica Mercedes y
Martín Ferreyra. INIMEC-CONICET-UNC



Universidad
Nacional
de Córdoba

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Córdoba, Argentina.
2013.

COMISIÓN ASESORA:

Dra. Laura Vivas. Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra. INIMEC-CONICET-UNC.

Dra. Irene Martijena. Departamento de Farmacología, IFEC-CONICET . Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba.

Dra. María Gabriela Paglini. Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra. INIMEC-CONICET-UNC.

Defensa oral y Pública.

Lugar y Fecha:

Calificación.

Tribunal

Firma:.....

Aclaración:.....

Firma:.....

Aclaración:.....

Firma:.....

Aclaración:.....

A mis padres.

AGRADECIMIENTOS.

Esta tesis no hubiese sido posible sin la ayuda, colaboración y asistencia de las siguientes personas, a toda ellas mis más profundos y sinceros agradecimientos:

- A mis padres Juan José y Edith, y a mis hermanos Mauro y Claudio, a quienes quiero tanto, por su apoyo incondicional.
- A mi directora, Dra. María Gabriela Paglini, con quien he trabajado desde el año 2007, por abrirme las puertas de su laboratorio, y permitirme realizar mi tesis en él. Por todas sus enseñanzas tanto a nivel científico como humano, por siempre confiar en mi, en mi trabajo y en mis ideas, y por todo el apoyo que recibí durante todos estos años.
- A la comisión asesora de tesis, Dra. Vivas y Dra. Martijena, por el seguimiento, sugerencias y discusiones científica durante la realización de este trabajo.
- A los miembros del tribunal por las correcciones y sugerencias realizadas a este manuscrito.
- A mis compañeros y amigos de laboratorio, tanto los que hemos pasados más años juntos Soledad Ferreras, Victoria Pisano y Carlos Arias, como los mas recientes Guillermo Fernandez, Damian Revillo y Evelyn Cotella, quería agradecerles todo el tiempo compartido durante estos años, por toda la ayuda en la realización y diseños de los experimentos, por todas las charlas científicas, por todos los consejos tanto en la realización de experimentos como para la vida, por aguantarme cuando mi humor no era el mejor y por todos los hermosos momentos que pasamos juntos dentro y fuera del laboratorio. Pasar tanto tiempo con ustedes no solo me ha ayudado a ser mejor científico, sino también una mejor persona, los quiero mucho a todos.
- Una mención especial para Guillermo Fernández por su ayuda y excelente trabajo en la producción de los ratones p35KO en la ultima etapa de esta tesis.
- A mis amigos en el Instituto Ferreyra de otros laboratorios, Stefanía Castelló, Anabela Palandri, Franco Mir, José Wojnacki, todo este tiempo ha sido mucho más lindo gracias a ustedes.

- A tanta gente linda del instituto Ferreyra con la que he tenido suerte de coincidir: Victoria Rozes, Ana Vivineto, Gonzalo Quazollo, María Jose Virgolini, Lujan Maseroni, Gimena Farias, Cristina Arias, Mónica Sanchez y Pablo Helguera, etc....
- A Mariano Bisbal, Laura Gastaldi y Mónica Remedi, por toda su ayuda, aclaración de dudas y enseñanzas de técnicas.
- A Cecilia Mlewski por enseñarme gran parte de las técnicas utilizadas en este trabajo.
- Al lic. Cristian Hansen, por su ayuda en las determinaciones de dopamina y sus metabolitos por medio de HPLC.
- A la Dra. Ximena Caeiro por su asistencia en la puesta a punto inicial en la genotipificación de los ratones p35KO y pos su ayuda durante el tiempo que compartimos bioterio.
- A la Dra. Soledad de Olmos, por su asistencia en la realización de las inmunohistoquímicas de TH. A la Dra. Graciela Elso y Myrian Siravegna por su asistencia en la puesta a punto experimento de captación de DA. Al Dr. Luciano Ponce y la Dra. Paula Abate por sus sugerencias durante el diseño de los experimentos conductuales.
- A la Dra. Carolina Touz y su laboratorio pos su ayuda en al secuenciación de muestras de DNA del ratón p35KO.
- A la Dra. Julia Cambiasso por su ayuda durante la mudanzas y nuevo alojamiento de los ratones p35KO durante las remodelación del bioterio.
- A los técnicos del Bioterio del Instituto Ferreyra por su gran trabajo y su buena onda, ninguna tesis seria posible sin su labor.
- A todo el personal, actual y pasado del Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra, por toda su ayuda y buena predisposición durante el desarrollo de este trabajo.
- A todas esas personas que por algún motivo haya olvidado nombrar mis disculpas y mis gratitudes.

Listado de publicaciones derivadas de esta tesis.

Krapacher FA, Mlewski EC, Ferreras S, Pisano V, Paolorossi M, Hansen C, Paglini G (2010).
Mice lacking p35 display hyperactivity and paradoxical response to psychostimulants.
J Neurochem 114:203-214.

INDICE

COMISION ASESORA	1
DEDICATORIA.	2
AGRADECIMIENTOS.	3
LISTADO DE PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS	5
INDICE	6
LISTA DE ABREVIATURAS	10
RESUMEN	15
SUMMARY	16
INTRODUCCION.	17
EL TRASTORNO DE DEFICIT DE ATENCIÓN E HIPERACTIVIDAD (TDAH).	17
Generalidades	17
Etiología	19
Heredabilidad	19
Factores ambientales.	20
Contribuciones genéticas.	21
<i>Tratamientos</i>	22
Tratamientos farmacológicos.	23
Intervenciones psicoterapéuticas.	26
<i>Neuroanatomía</i>	27
<i>Neuropsicología</i>	30
Modelos basados en alteraciones en funciones ejecutivas.	31
Modelos basados en mecanismos motivacionales o de recompensa	33
<i>Modelos animales</i>	34
LA DOPAMINA	40
Generalidades.	40
<i>Neuroanatomía de los circuitos dopaminérgicos.</i>	42
Características de las áreas que producen y liberan DA.	42
Características de los núcleos que reciben inervación dopaminérgica.	45
Biosíntesis de la dopamina.	49
Regulación de la enzima Tirosina hidroxilasa.	50
Liberación de la dopamina.	54
Remoción de la dopamina del espacio sináptico	55

<i>Degradación enzimática y metabolismo de la dopamina.</i>	57
<i>Receptores dopaminérgicos.</i>	58
Los receptores acoplados a proteína G.	58
Tipos de receptores dopaminérgicos.	59
Receptor D1.	61
Receptor D5.	61
Receptor D2	62
Receptor D3	62
Receptor D4.	63
Colocalización entre receptores D1 y D2.	63
LA QUINASA DEPENDIENTE DE CICLINAS 5 (CDK5).	65
<i>Generalidades.</i>	65
<i>Activación.</i>	65
<i>Funciones de CDK5</i>	67
Adhesión y migración celular.	67
CDK5 en la dinámica del citoesqueleto.	69
CDK5 en exocitosis y endocitosis de vesículas sinápticas.	70
Regulación de la función sináptica.	71
CDK5 en la integración de la señalización dopaminérgica.	72
CDK5 en aprendizaje y memoria.	74
CDK5 en sensibilización y a adicción a psicoestimulantes	74
OBJETIVOS E HIPOTESIS	77
OBJETIVO GENERAL	77
HIPOTESIS	78
OBJETIVOS ESPECIFICOS.	78
MATERIALES Y METODOS.	79
ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	79
<i>Cría y Mantenimiento</i>	79
<i>Ratones transgénicos</i>	76
GENOTIPIFICACIÓN DE LOS RATONES p35KO y WT	80
<i>Obtención de la muestra de tejido</i>	81
<i>Extracción y purificación del ADN genómico</i>	81
<i>Reacción en Cadena de la Polimerasa</i>	82

EXPERIMENTOS CONDUCTUALES	83
<i>Actividad locomotora espontanea</i>	83
<i>Efectos de los psicoestimulantes en la actividad locomotora</i>	83
<i>Evaluación del rol de los receptores D1 y D2 en la actividad locomotora</i>	84
<i>Laberinto en cruz elevado</i>	85
EXPERIMENTOS BIOQUÍMICOS	85
<i>Tinción inmnohistoquímica de la enzima tirosina hidroxilasa</i>	85
<i>Análisis por western blot de los niveles de tirosina hidroxilasa</i>	87
<i>Determinación de los niveles de DA, DOPAC y l-DOPA</i>	88
ANALISIS ESTADISTICO	89
RESULTADOS	91
SECCIÓN 1: CARACTERIZACIÓN CONDUCTUAL DEL RATON p35KO.	91
1.1 <i>Los ratones p35KO exhiben hiperactividad locomotora a edades juveniles</i>	91
1.2 <i>Los ratones p35KO responden de manera paradójal a psicoestimulantes</i>	93
1.3 <i>Los ratones p35KO presentan menores niveles de ansiedad</i>	98
SECCIÓN 2: CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA NEUROTRANSMISIÓN DOPAMINERGICA DEL RATON p35KO	99
2.1 <i>Los ratones juveniles deficientes en p35 presentan elevados niveles de la enzima tirosina hidroxilasa y mayor síntesis de DA</i>	99
2.2 <i>Los niveles de TH, la síntesis y metabolismo de DA son normales en ratones p35KO adultos</i>	101
SECCIÓN 3: METABOLISMO DE LA DOPAMINA EN LOS RATONES p35KO.	102
3.1 <i>La administración de ANF Y MTF normalizan los niveles de DA y DOPAC en los ratones p35KO</i>	103
3.2 <i>El tratamiento con ANF o MTF produce una disminución de los niveles de TH en ratones p35KO</i>	105
SECCIÓN 4: PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES D1 Y D2 EN LA HIPERACTIVIDAD DEL RATON p35KO	107
4.1. <i>Función de los receptores de DA D1 en el establecimiento del fenotipo hiperactivo de los ratones p35KO</i>	107
4.1.1 <i>La función del receptor D1 es necesaria para la expresión de la hiperactividad locomotora de ratones p35KO</i>	107
4.1.2 <i>La funcionalidad del receptor D1 no se encontraría alterada en el ratón p35KO</i>	110

4.2 <i>Participación de los receptores D2 en el perfil locomotor de ratones p35KO</i>	113
4.2.1 La activación de los receptores D2 presinápticos produce inhibición de la actividad locomotora en ratones p35KO	113
4.2.2 La inhibición de los receptores D2 postsinápticos disminuye la actividad locomotora en ratones de ambos genotipos	116
4.2.3 Respuesta alterada a bajas dosis de haloperidol en ratones p35KO	120
DISCUSIÓN	124
<i>Consideraciones finales</i>	148
CONCLUSIONES	152
BIBLIOGRAFÍA	154

Lista de abreviaturas (por orden alfabético):

5-HT: Serotonina.

6-OHDA: 6-hidroxidopamina.

AADC: Descarboxilasa de l-aminoácidos aromáticos.

ABL: Amígdala basolateral.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AMPc: Adenosina monofosfato cíclica.

ANF: Anfetamina.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

ATP: Adenosina trifosfato.

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro.

BH₂: Dihidrobiopterina.

BH₄: Tetrahidrobiopterina.

Calpaina: Proteasa de cisteinas dependiente de Ca²⁺.

CaMPK-2: Quinasa regulada por Ca²⁺ y calmodulina, 2.

Cdh: Cadherina.

CDK: Quinasa dependiente de ciclina.

CDK5: Quinasa dependiente de ciclina 5.

CK2: caseína quinasa 2.

COC: Cocaína.

COMT: Catecol-O-metiltransferasa.

CpF: Corteza prefrontal.

Ctn: Cateninas.

D1: Receptor de dopamina 1.

D2: Receptor de dopamina 2.

D2l: Receptor de dopamina D2 isoforma larga.

D2s: Receptor de dopamina D2 isoforma corta.

D3: Receptor de dopamina 3.

D4: Receptor de dopamina 4.

D5: Receptor de dopamina 5.

DA: Dopamina.

DAG: Diacilglicerol.

DARPP-32: Fosfoproteína regulada por dopamina y AMPc, de peso molecular 32kDa.

DARPP-32_{tre34}: Fosfoproteína regulada por dopamina y AMPc, de peso molecular 32kDa, fosforilada en la treonina34.

DARPP-32_{tre75}: Fosfoproteína regulada por dopamina y AMPc, de peso molecular 32kDa, fosforilada en la treonina 75.

DAT: Transportador de dopamina.

DAT-CI: Ratón con transportador de dopamina insensible a cocaína

DAT-KD: Ratón knock-down para el transportador de dopamina.

DAT-KO: Knock-out para el transportador de dopamina.

Din: Dineína.

DOPAC: Ácido dihidroxifenil-acético

DSM-IV: Manual de diagnóstico y estadísticas de la Asociación Americana de Psiquiatría, versión IV.

ERK: Quinasa regulada por señales extracelulares.

fMRI: Imagen por resonancia magnética funcional.

GABA: Ácido γ -aminobutírico.

GDP: Guanina difosfato.

GIRK2: Canal de corrientes rectificantes de K⁺ regulado por proteína G, 2.

GLU: Glutamato.

GPe: Segmento externo del globus pallidus.

GPi: Segmento interno del globus pallidus.

GTP: Guanina trifosfato.

HAL: Haloperidol.

hs: horas.

HTRB1: Receptor de serotonina 1B.

HVA: Ácido homovanílico.

i.p.: Intraperitoneal.

ICD-10: Clasificación Internacional de enfermedades de la Organización Mundial de la Salud, versión 10.

IP3: Inositol trifosfato

Knd: Kindlina.

KO: Knock-out.

I-DOPA: dihidroxifenilalanina.

Lc: Locus coeruleus

LCE: Laberinto en cruz elevado.

LTP: Potenciación a largo plazo.

MAO: Monoamino oxidasa.

MAP: Proteína asociada a microtúbulos

MAPKAPK2: Proteína quinasa activada por MAPK2.

MC: Vía mesocortical.

min: minutos.

ML: Vía mesolímbica.

MRI: Imagen por resonancia magnética.

MS: Vía mesoestriatal.

MTF: Metilfenidato.

NA: Noradrenalina.

NAC: Nucleus accumbens.

NAC_{core}: Región core del nucleus accumbens.

NAC_{shell}: Región shell del nucleus accumbens.

NAT: Transportador de noradrenalina.

NGF: Factor de crecimiento nervioso.

NHE: Rata de alta excitabilidad de Nápoles.

NMDA: Receptor de glutamato de N-metil-D-aspartato.

NSM: Neuronas espinosas medianas.

p35: Activador de CDK5 de 35kDa.

p39: Activador de CDK5 de 39kDa.

PAK1: quinasa activada por p21.

PCB: Bifenilpoliclorado.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PET: Tomografía por emisión de positrones.

PI3K: Quinasa de fosfoinositol-3.
PIP2: Fosfatidil-inositol bifosfato.
PKA: Proteína quinasa A.
PKC: Proteína quinasa C.
PLC: Fosfolipasa C.
PP1: Proteína fosfatasa 1.
PP2A: Proteína fosfatasa 2A.
PP2B: Proteína fosfatasa 2B.
PPSE: Potencial postsináptico excitatorio.
PRAK: Proteína quinasa activada y regulada por p21.
Pxn: Paxilina.
QNP: Quinpirole
Rln: Relina.
Sal: Solución salina de NaCl 0,9%.
Sem3A: Semaforina 3A.
SERT: Transportador de serotonina.
SHL: Septum lateral del hipocampo.
SHR: Rata hipertensa espontanea.
SN: Substancia nigra:
SNAP-25: Proteína asociada a sinaptosomas de 25kDa.
SNc: Substancia nigra pars compacta.
SNr: Substancia nigra pars reticulata.
Str: Cuerpo estriado.
TDAH: trastorno de Déficit de Atención e Hiperactividad.
TH: Tirosina hidroxilasa.
TIRFM: Microscopia de reflexión total de fluorescencia interna.
TK: Tirosina quinasa.
Tln: Talina.
Tre: Treonina.
VMAT-2: Transportador vesicular de monoaminas 2.
VTA: Área tegmental ventral.

WKY: Rata Wistar-Kyoto.

WT: Wild type, tipo salvaje.

RESUMEN

El Trastorno por Déficit de Atención con Hiperactividad (TDAH) es un desorden psiquiátrico permanente que se diagnostica al comienzo de la niñez. Se caracteriza por niños que presentan niveles de atención inapropiados para su estado de desarrollo, hiperactividad e impulsividad. El principal tratamiento para este desorden es el uso de drogas psicoestimulantes que actúan aumentando los niveles de dopamina en la cavidad sináptica.

Si bien las bases de esta condición no son del todo conocidas, numerosas evidencias indican que alteraciones en el funcionamiento de circuitos dopaminérgicos representarían las bases neurobiológicas de este trastorno.

La proteína CDK5 es un regulador muy importante de la función dopaminérgica, modulando la síntesis y liberación de dopamina y la eficiencia de la señalización.

Teniendo en cuenta que dopamina es sugerida como uno de los principales neurotransmisores implicados en la etiología del TDAH y que CDK5 es un importante modulador de la función de este neurotransmisor, nos propusimos estudiar la posible relación entre CDK5 y este trastorno mediante la caracterización conductual, bioquímica y farmacológica de un ratón transgénico que carece de la proteína p35, principal activador de CDK5.

En esta tesis, demostramos que la falta de p35 produce un fenotipo conductual hiperactivo, reversible mediante el uso de psicoestimulantes y con menor inhibición comportamental, lo que recapitula características claves de este trastorno. Por otro lado, demostramos la asociación de estos comportamientos con alteraciones en la síntesis y metabolismo de la dopamina. Finalmente, analizamos la participación de los receptores de dopamina D1 y D2 en el establecimiento de la hiperlocomoción de estos animales.

Los resultados obtenidos en esta tesis nos permitieron demostrar, por primera vez, una relación entre alteraciones en la función del complejo CDK5/p35 y el TDAH; indicando que el ratón p35KO puede modelar aspectos claves de este desorden.

SUMMARY

Attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD) is a permanent psychiatric condition, which is diagnosed at the onset of childhood. This disorder is characterized by children displaying developmentally inappropriate levels of inattention, hyperactivity and impulsivity. The main treatment for ADHD is the use of psychostimulant drugs, which are believed to enhance dopamine neurotransmission.

TDAH etiology is not totally understood, but a great number of studies support the idea that deregulation of dopamine circuits underlies this disorder.

CDK5 protein is a key regulator of dopaminergic neurotransmission; in presynaptic neurons, CDK5 modulates the dopamine synthesis and release; meanwhile, in postsynaptic neurons, regulates the efficiency of dopamine signaling.

Taking into account the role of dopamine in the pathophysiology of TDAH and the crucial role of CDK5 in the dopaminergic function, we decided to evaluate the possible relationship between CDK5 dysfunction and TDAH, through the behavioral, biochemical, and pharmacological characterization of a transgenic mice lacking the CDK5 activator p35.

In this work, we demonstrated that the absence of p35 produce in mice locomotor hyperactivity, psychostimulant-induced hypoactivity and deficit in behavioral inhibition, reminiscent of some aspects of ADHD. Moreover, we found alterations in dopamine synthesis and release. Finally, we analyzed the role of D1 and D2 dopaminergic receptors in the onset of hyperactivity in these animals.

The results obtained in this thesis work allowed us to demonstrate, for a first time, a relationship between dysfunctions of CDK5/p35 complex and ADHD, suggesting that the p35KO mice can model the key features of this disorder.

INTRODUCCIÓN.

EL TRASTORNO POR DÉFICIT DE ATENCIÓN CON HIPERACTIVIDAD.

Generalidades

En los últimos 20 años, el Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad (TDAH) ha recibido gran atención en la literatura científica, experimentando un crecimiento exponencial del número de publicaciones relacionadas con todos los aspectos de este desorden (Lopez-Munoz *y col.*, 2008), pasando de aproximadamente 200 artículos al principio de los años 1990 a más de 2.000 en el año 2012 (según datos de Pubmed, Biblioteca Nacional de Medicina, Instituto Nacional de Salud, NLM-NIH, Bethesda, MD, Estados Unidos). Las personas afectadas por este desorden tienen una menor calidad de vida, incluyendo serios impedimentos en su funcionamiento académico, laboral, social e interpersonal (Antshel *y col.*, 2011); además de que en casos frecuentes puede presentar comorbilidad con trastornos del estado de ánimo, comportamientos disruptivos y problemas de aprendizaje (Antshel *y col.*, 2011).

El TDAH es un trastorno neurobiológico permanente y debilitante, que se expresa típicamente al inicio de la edad escolar (Applegate *y col.*, 1997), representando el trastorno psiquiátrico más diagnosticado en niños. Si bien existe una gran cantidad de trabajos sobre la incidencia del TDAH, los resultados que estos arrojan han sido poco homogéneos, citando valores de prevalencia que varían desde el 4% a más del 12% (Faraone *y col.*, 2003; Biederman, 2005), sin embargo un meta-análisis reciente sugiere una prevalencia basada en la bibliografía de aproximadamente el 5,3% (Polanczyk *y col.*, 2007).

Si bien los síntomas comienzan a edades tempranas y el TDAH ha sido considerado durante muchos años una patología propia de la niñez, en la actualidad y desde hace varios años se reconoce ampliamente que este trastorno continúa en la adolescencia y en la vida adulta (Kessler *y col.*, 2006).

Los componentes atencionales suelen manifestarse como distractibilidad, dificultad para focalizarse en una única tarea durante tiempos prolongados y por periodos de “soñar despierto”, mientras que la hiperactividad se expresa como personas inquietas que hablan excesivamente, que no pueden permanecer en un solo lugar, y que agitan piernas o realizan

permanentemente movimientos repetitivos con sus manos (Biederman, 2005). Estos síntomas del TDAH predisponen a accidentes, crean tensión en las relaciones interpersonales y perturban ambientes académicos o laborales mediante interrupciones o comportamientos inapropiados.

El TDAH se define y diagnostica de acuerdo a los criterios expuestos en la cuarta versión del Manual de Diagnóstico y Estadística de la Asociación Americana de Psiquiatría (DSM-IV) (Tabla 1) y en la décima edición de la Clasificación Internacional Estadística de Enfermedades y Problemas relacionados a la Salud de la Organización Mundial de la Salud (ICD-10); esta última designa a este trastorno bajo el nombre de desorden hiperquinético. Si bien el criterio de diagnóstico del ICD-10 es más riguroso que el expresado en el DSM-IV, ambas clasificaciones incluyen niños que presentan niveles de atención inapropiados para su

Tabla 1: Criterios para el diagnóstico del TDAH^a según el DSM-IV^b

A-De 1 o 2:

1. Seis (o más) de los siguientes síntomas de inatención durante al menos 6 meses, al grado de ser maladaptativo o inconsistente con el nivel de desarrollo.
 - a. A veces falla en prestar atención a los detalles o comete errores despreocupados en la escuela, trabajo o en otras actividades.
 - b. A veces tiene dificultades en mantener la atención en tareas o juegos.
 - c. Con frecuencia parece no escuchar cuando le hablan directamente
 - d. A veces no sigue las instrucciones, y falla en finalizar la tarea escolar u otros deberes.
 - e. A veces tiene dificultades en organizar tareas o actividades
 - f. Evita o es renuente a comprometerse en tareas que requieren un esfuerzo mental sostenido.
 - g. A veces pierde objetos necesarios para tareas o actividades
 - h. Es fácilmente distraído por estímulos externos.
 - i. Es usualmente olvidadizo en las actividades diarias.
2. Seis (o más) de los siguientes síntomas de Hiperactividad/impulsividad durante al menos 6 meses, al grado de ser maladaptativo o inconsistente con el nivel de desarrollo.
 - a. A veces agita las manos o pies o se retuercen estando sentado.
 - b. A veces dejan su asiento en clases o en otras situaciones donde se espera permanezca sentado.
 - c. A veces corre alrededor o trepa objetos en situaciones en que esto es inadecuado.
 - d. A veces no puede participar en actividades recreativas de forma silenciosa
 - e. A veces actúa como "impulsado por un motor".
 - f. A veces habla excesivamente
 - g. A veces emite respuestas antes de que las preguntas hallan terminado
 - h. A veces tienen dificultades esperando su turno.
 - i. A veces interrumpe a otros, en conversaciones, juegos u otras actividades

B. Algunos síntomas hiperactivos/impulsivos o inatensivos, que causan impedimentos deben aparecer antes de los 7 años de edad.

C. Algunos problemas causados por los síntomas deben presentarse en al menos dos ámbitos distintos.

D. Debe existir una clara evidencia de la existencia de impedimentos clínicamente significativos en el funcionamiento social, académico o laboral.

E. Los síntomas no deben ocurrir solo exclusivamente durante el curso de desorden generalizado del desarrollo, esquizofrenia u otro desorden psicótico y no debe ser mejor explicado por otro desorden mental.

Modificado de Antshel y col., 2011.

^a: Trastorno de déficit de atención e hiperactividad

^b: Manual de diagnóstico y estadísticas de la Asociación Americana de Psiquiatría, versión IV.

estado de desarrollo, hiperactividad e impulsividad que provocan impedimentos en el rendimiento escolar, en funciones intelectuales y en habilidades sociales (Biederman y Faraone, 2005). El DSM-IV reconoce tres subtipos de TDAH, principalmente inatensivo, principalmente hiperactivo, o combinado, debido a que este criterio de diagnóstico requiere de la presencia de al menos 6 de 9 marcadores de inatención o de al menos 6 de 9 síntomas de hiperactividad-impulsividad, a partir de los cuales se computan los subtipos. A diferencia del DSM-IV, el ICD-10 no reconoce subcategorías para esta enfermedad y requiere para el diagnóstico de esta, tanto de la presencia de 6 de 8 síntomas de falta de atención, 3 de 5 síntomas de hiperactividad y 1 de 4 síntomas de impulsividad. Además ambos criterios requieren que estos síntomas se presenten en al menos dos ámbitos diferentes, como el hogar o la escuela, y que estos impedimentos produzcan problemas significativos en el rendimiento académico, social o laboral (Castellanos y Tannock, 2002; Lee y col., 2008). Sin embargo, aunque se diagnostica como un desorden categórico, el TDAH podría también ser explicado como los casos extremos de inatención o hiperactividad con respecto a la distribución normal de estos comportamientos en la población (Levy y col., 1997).

Etiología

Heredabilidad.

Si bien las causas de este trastorno no son del todo conocidas, numerosas evidencias indican que dentro de los factores etiológicos, existen no sólo variaciones o mutaciones genéticas sino también factores ambientales y la interacción entre estos y los componentes genéticos, lo que dificulta la identificación y el análisis de su etiología (Castellanos y Tannock, 2002).

Estudios familiares muestran que sujetos emparentados con personas con TDAH tienen una mayor probabilidad de ser también diagnosticados con este desorden. De hecho, numerosos estudios indican que el TDAH se transmite entre familias con una heredabilidad estimada muy alta, de alrededor de un 76% (Faraone y col., 2005). Como la influencia familiar en el desarrollo de los síntomas del TDAH puede ser tanto ambiental como genética, los estudios de gemelos univitelinos han sido muy útiles para determinar la contribución de estos factores. Los estudios de gemelos muestran una heredabilidad de más del 70% en

niños y adolescentes (Faraone y col., 2005), mientras que en adultos ésta es mucho menor, de aproximadamente un 30%, probablemente debido a la mayor variación ambiental en la vida adulta (Boomsma y col., 2010).

Factores ambientales.

Varias condiciones ambientales se han relacionado con mayores riesgos de adquirir TDAH (Tabla 2). Durante el embarazo, complicaciones como hemorragias, eclampsia, toxemias, mala salud y estrés maternal pueden producir un mayor riesgos de padecer TDAH por parte del niño (Pineda y col., 2007; Nikolas y Burt, 2010; Talge y col., 2007). El consumo de tabaco y alcohol y la exposición a plomo se han relacionado con la incidencia del TDAH (Mick y col., 2002; Thapar y col., 2003; Autti-Ramo, 2000; Nicolescu y col., 2010). Además, la hipoxia durante el nacimiento, el nacimiento prematuro o el peso muy bajo al nacer constituyen factores de riesgo del TDAH (Bhutta y col., 2002; Boksa y El-Khodor, 2003; Strang-Karlsson y col., 2008).

Tabla 2: Factores ambientales que pueden predisponer al TDAH.

Complicaciones durante el embarazo.
Estrés materno
Toxemias
Hemorragias
Eclampsia
Complicaciones durante el parto
Hipoxias
Bajo peso al nacer
Nacimiento prematuros
Factores ambientales
Exposición a plomo o PCB.
Factores sociales y/o psicológicos.
Familias disfuncionales
Criminalidad paterna.
Ausencia de uno de los padres
Escolarización tardía

Muchos estudios también han relacionado una mayor prevalencia de TDAH en niños con situaciones familiares adversas, como familias disfuncionales, familias con conflictos o peleas permanentes, criminalidad paterna, psicopatologías maternas, bajo nivel educacional de los padres, educación por familias sustitutas o escolarización tardía (Biederman y col., 1995; Ellis y Nigg, 2009; Kreppner y col., 2001); sin embargo estos no serían factores de riesgo específicos de TDAH sino que constituyen predictores universales del funcionamiento adaptativo y la salud mental de los niños (Biederman, 2005).

Por otro lado, si bien estos trabajos evidencian una gran incidencia de los factores ambientales, en estudios de adopción y en gemelos, indican que la heredabilidad del TDAH es mucho mayor entre gemelos que entre niños no relacionados biológicamente en familias adoptivas (Sprich y col., 2000). Además, otros estudios muestran que ciertos factores ambientales serian solo determinares cuando existe algún nexo biológico, por ejemplo, datos provenientes de embarazos mediante fecundación *in vitro*, señalan que el estrés materno se

relaciona con mayor incidencia del TDAH en los hijos, solo cuando los niños provenían de óvulos de dichas madres y no de donantes (Rice y *col.*, 2010).

Contribuciones genéticas

Los estudios moleculares sugieren que la arquitectura genética del TDAH es compleja y los resultados encontrados muchas veces son divergentes. Varios equipos han realizado estudios de ligamiento de genoma completo, una estrategia que examina muchos marcadores en el ácido desoxiribunucleico (ADN) para determinar si regiones cromosómicas son compartidas mas de lo esperado en familias con TDAH. Estos estudios muestran asociación en algunos loci de distintos cromosomas, sin embargo, estas asociaciones no se superponen con las encontradas en otros estudios o en distintos grupos étnicos o geográficos (Mick y Faraone, 2008). Un meta-análisis de los estudios genéticos de amplias regiones genómicas solo ha mostrado una pequeña superposición en el cromosoma 16q23.1, pero ningún loci presente en esta región se ha relacionado con genes candidatos para TDAH (Zhou y *col.*, 2008), sugiriendo que genes con relativamente gran efecto, probablemente, no existan. Debido a que estos métodos solo son útiles para detectar efectos génicos fuertes, otros tipos de estudios son mas indicados para analizar contribuciones genéticas menos potentes.

En contraste al método anterior, el estudio de asociación de genes candidatos es mucho mas sensible para detectar efectos génicos pequeños. En estos estudios, los investigadores eligen *a priori* los genes a estudiar, en base a estudios neurológicos o consideraciones teóricas que sugieren que el producto de dichos genes podría estar relacionado con la patofisiología de la enfermedad a estudiar. Usando esta metodología, numerosos meta-análisis sugieren la asociación de varios genes relacionados con la neurotransmisión dopaminérgica (Faraone y Mick, 2010), entre los cuales se encuentran los receptores de dopamina (DA) D4 y D5, la enzima dopamina- β -hidroxilasa (Li y *col.*, 2006), el receptor de serotonina (5-HT)B1 (HTRB1), y el transportador de 5-HT (SERT) (Faraone y *col.*, 2005). Además, se ha encontrado una débil asociación con este desorden con genes que codifican para el transportador de DA (DAT) (Li y *col.*, 2006) y para la proteína asociada a sinaptosomas de 25kDa (SNAP-25), que participa en la fusión de vesículas sinápticas (Faraone y *col.*, 2005) (Tabla 3).

Tabla 3: Genes con polimorfismo relacionados con TDAH^{a,b y c}.

Gen	Proteína que codifica
DRD4	Receptor de DA D4
DRD5	Receptor de DA D5
DBH	Enzima dopamina- β -hidroxilasa
HTR1B	Receptor de 5-HT 1B
SLC6A4	Transportador de 5-HT
SLC6A3	Transportador de DA
SNAP25	Proteína SNAP-25

^a. (Faraone y Mick, 2010).

^b. (Li y col., 2006).

^c. (Brookes y col., 2006).

Una de la mayores contribuciones en el entendimiento de la genética molecular del TDAH fue la publicación de los resultados provenientes del Proyecto Internacional de genes multisitio de TDAH (IMAGE, por sus siglas en ingles) en el que se analizaron 51 genes de 664 familias con al menos un miembro diagnosticado “TDAH tipo combinado”. Los genes analizados se eligieron en base a aquellos correspondientes a vías de neurotransmisión

relacionadas previamente con TDAH, es decir DA, 5-HT y noradrenalina (NA), basados en polimorfismos en regiones funcionales de dichos genes. Este proyecto detectó 18 genes con fuerte asociación con el TDAH (Brookes y col., 2006).

A pesar de la gran cantidad de datos provenientes de estudios genéticos, los resultados siguen siendo dispersos y poco replicados e incluso, a veces, contradictorios. Sin embargo, meta-análisis recientes apoyan particularmente el aporte de genes que codifican para D4, D5, DAT, HTR1B y SNAP-25 en la etiología del TDAH. Probablemente, teniendo en cuenta que estos resultados apoyan la idea de genes con efectos pequeños, estudios de fenotipos mas refinados o de endofenotipos serían necesarios para reducir la variabilidad de los datos y avanzar en la búsqueda de nuevos genes candidatos (Tabla 3).

Tratamientos.

Los tratamientos del TDAH se puede encarar mediante estrategias farmacológicas e intervenciones psicoterapéuticas, siendo la correcta combinación de ambas lo que suele tener mejores resultados, no solo en los síntomas, sino también en el rendimiento académico y profesional a largo plazo. En general el tratamiento farmacológico es efectivo en el mejoramiento de los síntomas principales del TDAH, mientras que para los problemas asociados, los mejores resultados se obtienen mediante intervenciones psicológicas y modificaciones ambientales (Pierce, 2011).

Tratamientos farmacológicos.

Para la mayoría de los pacientes con TDAH, el uso de psicoestimulantes es el abordaje farmacológico de primera opción, debido a su eficacia en reducir los síntomas y a que los efectos adversos de estos son aceptables; sin embargo muchos pacientes no responden a este tipo de medicamentos o no pueden tolerar los efectos adversos de éstos, para los cuales drogas no psicoestimulantes suelen ser una opción mas adecuada (Antshel y col., 2011) (Tabla 4).

Tabla 4: Tratamientos farmacológicos para el TDAH.

	<i>Mecanismo de acción</i>
Psicoestimulantes	
Metilfenidato	Bloquea la recaptación de DA y mas levemente de NA.
Anfetaminas	Bloquea la recaptación de DA y y mas levemente de NA. Induce liberación de DA desde las vesiculas sinápticas.
No psicoestimulantes	
Atomoxetina	Bloquea la recaptación de NA
Clonidina	Agonista especifico de receptores alfa2-adrenérgicos.
Guanfacina	Agonista especifico de receptores alfa2-adrenérgicos.

Modificado de Antshel y col., 2011.

El primer reporte de uso de psicoestimulantes para tratar desórdenes comportamentales en niños data del año 1937 (Strohl, 2011), sin embargo durante mas de 25 años estos estudios fueron poco tenidos en cuenta hasta finales de la década del 50, donde la investigación en este tipo de tratamientos tomó nuevamente impulso (Lange y col., 2010). En la actualidad los fármacos mas utilizados son el metilfenidato (MTF), conocido por el nombre comercial de Ritalina®, y la anfetamina (ANF), la cual puede administrarse solo el isómero activo (d-anfetamina) o como mezcla entre el isómero activo y el inactivo (d,l-anfetamina), siendo los nombres comerciales mas conocidos Dexedrina® y Aderall®, respectivamente. Ambos tipos de compuestos actúan aumentando la concentración de DA y NA en el espacio sináptico, aunque lo hacen por mecanismos diferentes. El MTF bloquea a los transportadores de DA y de NA (NAT), que son los responsables de remover de la cavidad sináptica la DA y la NA liberada por los potenciales de acción (Goodwin y col., 2009). El mecanismo de acción de ANF es mas complejo, ésta actúa como un inhibidor competitivo de DAT, ya que funciona como un sustrato de este, el cual la transporta al interior del terminal sináptico. Una vez dentro del terminal, ANF es trasportada al interior de las vesículas

sinápticas por medio de difusión y a través del transportador vesicular de monoaminas tipo 2 (VMAT-2), donde aumenta el pH de estas y produce que la DA se libere dentro del terminal sináptico, donde finalmente escapa de la célula mediante un transporte reverso a través del DAT (Sulzer y *col.*, 2005; Leviel, 2011) (Figura 1). Si bien sus mecanismos de acción son diferentes, ambos tipos de compuestos actúan optimizando la neurotransmisión por DA y NA en corteza prefrontal (CpF) y cuerpo estriado (Str) (Spencer y *col.*, 2004), lo cual produce una mejora en la atención, disminuyendo la hiperactividad y mejorando ligeramente las funciones ejecutivas (la habilidad de planear acciones e inhibir impulsos) (Solanto, 1998).

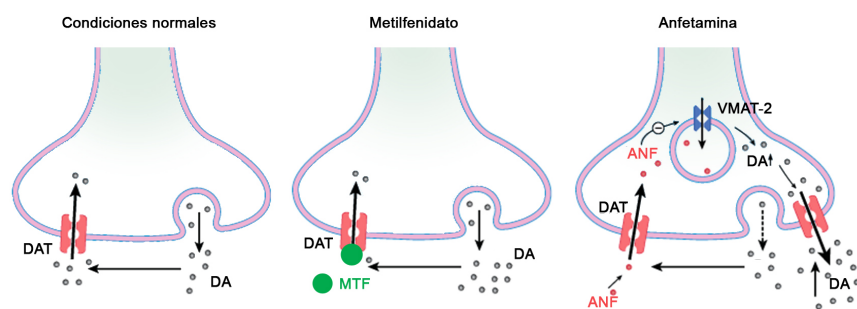


Figura 1: Mecanismo de acción de los psicoestimulantes. DAT: transportador de dopamina. DA: dopamina. ANF: anfetamina. MTF, metilfenidato. VMAT-2 Transportador de monoaminas 2.

El uso de estas drogas ha sido desde su inicio, motivo de controversia, debido a su perfil farmacológico que las convierte potencialmente en drogas de abuso, a sus efectos adversos, y a su poco probada eficacia en mejorar el rendimiento escolar a largo plazo (Advokat, 2010). En primer lugar se ha demostrado que la ANF es una droga de abuso que puede producir adicción y dependencia, y el MTF es, en su mecanismo de acción prácticamente idéntico a la cocaína (COC), por lo que su uso en niños (y también en adultos) ha sido siempre motivo de grandes discusiones. La literatura con respecto a esta temática suele estar dividida entre quienes sostienen que estos tratamientos en la niñez pueden predisponer o proteger al abuso de psicofármacos, sin embargo, los estudios más recientes y sólidos apoyan la idea de que utilizados de forma correcta no tendrían efectos indeseados de abuso y dependencia (Faraone y Wilens, 2007). A diferencia de las sales de anfetaminas puras, las formulaciones comerciales y las relativamente dosis bajas utilizadas no producen

estados de euforia (Solanto, 1998), uno de los aspectos claves en los efectos reforzantes de drogas de abuso. Con respecto al MTF, en la forma de administración oral utilizadas para este trastorno (a diferencia de si se administra de forma intravenosa) tampoco produce efectos eufóricos, debido a su a velocidad de absorción y a su cinética de unión al DAT (Volkow y *col.*, 1995). Además, el uso de nuevas vías de administración como parches dérmicos, bombas osmóticas o formulaciones de liberación prolongada, las cuales producen una curva de biodisponibilidad de la droga mas lenta y uniforme a lo largo del día, son aún más seguras, sobre todo en adultos (Kollins, 2008). Algunos estudios demuestran que un correcto tratamiento farmacológico es crucial en la forma en la que un individuo se enfrentará a los psicoestimulantes en el futuro; en este sentido, se ha demostrado que ratas sometidas a 8 meses de tratamiento con MTF, comenzando en la adolescencia, mostraron una disminución en la autoadministración de COC, sin embargo ratas con un tratamiento previo de solo dos meses con este fármaco presentaron mayores niveles de consumo voluntario de COC (Thanos y *col.*, 2007). Esto sugiere que son necesarios más estudios para determinar cual es la duración optima de los tratamientos y en que edad deben realizarse, con el fin de minimizar el posible riesgo de predisponer al consumo de drogas.

Por otro lado, aunque estos medicamentos son generalmente bien tolerados, suelen tener algunos efectos adversos, sin embargo su efectividad en reducir los síntomas del TDAH justifica su uso. Entre los efectos adversos mas comunes se encuentran problemas para dormir, dolores de cabeza y estómago (Wolraich y *col.*, 2011) y disminución del apetito, los que suelen relacionarse con menor peso y altura para la edad de dichos niños, aunque estos efectos suelen ser dosis dependientes y reversibles cuando se finaliza el tratamiento (Faraone y *col.*, 2008). En familias con historial de movimientos nerviosos estereotipados (tics), los psicoestimulantes suelen aumentar los riesgos de desarrollar este tipo de desorden, por lo que su uso no es recomendado en estos pacientes (Bloch y *col.*, 2009). También se han reportado problemas de hipertensión y cardíacos en personas con problemas renales o con problemas estructurales en el corazón, para los cuales los psicoestimulantes no son una opción de tratamiento.

Los tratamientos con fármacos no estimulantes, suelen ser una opción cuando por alguna condición previa, el paciente no pueda tolerar los efectos adversos de los psicoestimulantes o no responda a estos. Uno de los principales tratamientos no

estimulantes es el uso de atomoxetina, un inhibidor selectivo de NAT, lo que produce un aumento de los niveles de NA y también de DA en la CpF. Este fármaco suele ser bien tolerado y efectivo en casos en que los pacientes no responden a ANF o MTF, sin embargo su nivel global de eficacia es menor que el de los psicoestimulantes. Los efectos adversos suelen incluir dolores estomacales, pérdida del apetito, insomnio, náuseas y decaimiento y en algunos casos raros, daño hepático. Por otro lado, de manera similar a los antidepresivos, la atomoxetina suele producir un aumento en la ideación suicida, por lo cual no es recomendable en casos de TDAH combinados con estados depresivos (Whalen y *col.*, 2010)

Otro tratamiento utilizado para el TDAH es el uso de los agonistas selectivos de los receptores adrenérgicos α_2A , guanfacina y clonidina, pero solo en formulaciones de liberación progresiva; además estos pueden utilizarse conjuntamente con psicoestimulantes. El principal efecto secundario suele ser somnolencia leve o moderada, dolores de estomacales, reducción de la presión arterial y pérdida del apetito (Pierce, 2011).

Finalmente existen una serie de tratamientos que si bien han mostrado ciertos niveles de eficacia al reducir los síntomas del TDAH han sido discontinuados en su uso para el tratamiento de este desorden. El psicoestimulante pemolina fue retirado debido a su alto riesgo de producir daño hepático. Los antidepresivos tricíclicos fueron utilizados durante varios años para tratar el TDAH, sin embargo se lo relacionó con varios casos de muerte súbita en niños por lo cual fue discontinuado. El modafinil, un estimulante utilizado para tratar narcolepsia y apnea del sueño, mostró en ensayos clínicos mejoras de los síntomas en TDAH, sin embargo en estas pruebas se produjeron casos graves de lesiones en la piel incluido el síndrome de Stevens-Johnson, por lo que nunca fue aprobado como tratamiento para este desorden, ni para su uso en niños. El fármaco bupropión, un antidepresivo atípico, útil en casos de tratamiento de tabaquismo, produce disminución en los umbrales de epilepsia y se lo ha asociado con convulsiones por lo que no se aprobó su uso para TDAH en niños, sin embargo, es frecuentemente recetado para tratar el tabaquismo en adultos con TDAH (Brown y *col.*, 2005; Pierce, 2011; Biederman y Faraone, 2005).

Intervenciones psicoterapéuticas.

Diferentes intervenciones psicológicas pueden utilizarse solas o combinadas con farmacoterapia en el tratamiento del TDAH. En niños las intervenciones más importantes consisten en el entrenamiento de los padres en como manejar y mejorar las conductas de

sus hijos (Pierce, 2011). Para los niños, las psicoterapias más efectivas son las denominadas comportamentales, es decir, aquellas que se centran en modificar una conducta mediante una recompensa o reforzador; estas solo son efectivas cuando los comportamientos a mejorar son específicos, sin ambigüedades y responden a objetivos particulares, como por ejemplo, que el niño pase una cantidad de tiempo leyendo o dibujando; los objetivos más ambiguos como por ejemplo, “ser bueno” o “portarse bien” no sirven como parámetros de modificación de conducta (Pierce, 2011). Otro tipo de terapias denominadas de neuroretroalimentación (o neurofeedback), han mostrado ser efectivas en reducir la impulsividad y mejorar los problemas atencionales, pero son ineficaces en reducir la hiperactividad.

Tanto la terapia de modificación de comportamiento como la de neuroretroalimentación se basan en modelos comportamentales, los cuales sostienen que el desarrollo y mantenimiento de conductas tanto adaptativas como no adaptativas son explicables a través de los principios básicos del aprendizaje (condicionamiento clásico y operante); es decir, al menos en niños, estas terapias sostienen que estos comportamientos son mantenidos mediante un estímulo y su contingencia (Antshel y col., 2011).

En adultos, a diferencia de los niños, las terapias cognitivo/comportamentales han demostrado ser más eficientes en el tratamiento del TDAH (Pierce, 2011). Las terapias cognitivas se basan en la premisa de que la forma en la que una persona interpreta un evento es más importante que el evento en sí, por lo cual el tratamiento se basa más sobre la cognición que sobre el comportamiento, reduciendo los pensamientos disruptivos y produciendo un ajuste positivo en las acciones del paciente (Antshel y col., 2011).

Si bien las terapias psicológicas han demostrado ser eficientes en mejorar los síntomas del TDAH, existe un consenso general de que éstas constituyen un complemento de la farmacoterapia más que una alternativa, especialmente en niños y adolescentes (Brown y col., 2005).

Neuroanatomía.

Si bien gran cantidad de evidencias, tanto genéticas, de neuroimágenes, farmacológicas y derivadas del estudio con modelos animales indican que desregulaciones

en la neurotransmisión dopaminérgica y noradrenérgica están altamente implicadas en la patofisiología del TDAH, los mecanismos neurobiológicos precisos subyacentes a este desorden y a su tratamiento son aún escasamente comprendidos.

Numerosos estudios basados en neuroimágenes incluyendo resonancias magnética (MRI), tomografías por emisión de positrones (PET) y resonancias magnéticas funcionales (fMRI) inundan la bibliografía sobre el TDAH, aun así, durante los 30 años en que han realizado este tipo de trabajos, los resultados son muy variables, poco replicables y en algunos casos hasta tendenciosos y carentes de imparcialidad. En muchos casos los resultados son poco comparables debido a la variabilidad de técnicas, de las de las áreas cerebrales analizadas, o a las diferencias en los criterios de selección de los voluntarios; sin embargo, en los últimos años algunos estudios mejor diseñados y varios meta-análisis sobre los trabajos previos han permitido obtener algunos datos interesantes.

Teniendo en cuenta que los déficits en funciones ejecutivas señalan desregulaciones en áreas de la CpF que reciben inervación dopaminérgica y que otros fenómenos neuropsicológicos asociados al TDAH, como problemas motivacionales o de recompensa, están relacionados con núcleos que reciben gran cantidad de aferencias dopaminérgicas, los estudios de neuroimágenes se han centrado en estas áreas. Los primeros análisis realizados mediante MRI parecieron indicar que niños con TDAH presentaban menor volumen de ciertas áreas cerebrales como CpF y Str comparado con pacientes sanos (Castellanos y *col.*, 2002); los cuales luego dieron lugar a realizar estudios funcionales. Teniendo en cuenta que el DAT es el principal blanco de los psicoestimulantes usados en el tratamiento del TDAH, los primeros estudios de neuroimágenes funcionales se focalizaron en este marcador, los cuales condujeron a una serie de resultados bien replicados que mostraron que los pacientes con TDAH presentan una mayor densidad del DAT en Str (Spencer y *col.*, 2005; Del Campo y *col.*, 2011); incluso el grupo pionero en estos, llegó de forma irresponsable, a patentar este hallazgo como un método de diagnóstico (Del Campo y *col.*, 2011). Sin embargo, estudios mas recientes mediante PET han sido inconsistentes con estos, al encontrar menor densidad de DAT y receptores D2/D3 en áreas subcorticales (Volkow y *col.*, 2009). Los autores sugieren que estas diferencias podrían deberse a discrepancias en el historial de uso de psicoestimulantes o a polimorfismos del DAT (Del Campo y *col.*, 2011); lo que si es claro es que el uso de neuroimágenes de DAT como marcador biológico de TDAH para diagnóstico no

es recomendable, y que los niveles de DAT no siempre proporcionarían información real acerca de la neurobiología del TDAH, ya que la regulación de sus niveles requiere de varios factores, muchos de ellos aún desconocidos.

En CpF se ha encontrado menores niveles de los receptores D2/D3 y un menor metabolismo de DA en dicha área cerebral en adultos con TDAH comparado con la población control (Ernst y *col.*, 1998), si embargo, el mismo grupo no pudo replicar este último resultado en adolescentes mediante el uso de [¹⁸F]-fluorodopa, encontrando incluso el resultado opuesto (Ernst y *col.*, 1999). Por otra parte, estudios recientes indican un menor metabolismo de DA en Str y núcleos basales en pacientes con TDAH (Forsberg y *col.*, 2006).

Tomados en conjunto, los trabajos basados en neuroimágenes encuentran diferencias en marcadores relacionados con la DA en pacientes con TDAH, sin embargo los resultados suelen ser dependientes de la edad y del historial previo de consumo de psicoestimulantes u otras drogas (Ludolph y *col.*, 2008), los cuales si bien indican que la regulación de estos componentes de la maquinaria de neurotransmisión dopaminérgica se encuentra alterada, no permiten obtener información relevante de cómo estas alteraciones participarían en la patofisiología de este trastorno.

Por otro lado, si bien existe mucha evidencia acerca de la participación de DA en el establecimiento de los síntomas del TDAH, tanto a partir de los efectos de fármacos que afectan su funcionamiento, como de datos que confirman su rol en procesos atencionales y de planificación de acciones, la existencia de estudios de neuroimágenes para este neurotransmisor son prácticamente nulos (Del Campo y *col.*, 2011).

Aunque los estudios de neuroimágenes apuntan claramente a una base neurobiológica de este desorden, poco han aportado a entender los mecanismos patológicos y fisiológicos del mismo. Esto ha promovido a que varios grupos hayan propuesto un cambio en el enfoque de estos estudios, animados por conceptos emergentes de otras patologías como la esquizofrenia y el autismo (Nigg, 2012). Estos grupos han propuesto cambiar el paradigma que asume a una patología como una anomalía de una región particular del cerebro, hacia la existencia de una disfunción en la organización y distribución de redes neuronales entre distintos núcleos o áreas. Mientras que la tendencia predominante en el campo de las neuroimágenes ha sido la de una visión basada en el localizacionismo, que asume la segregación funcional del cerebro; la visión actual de la fisiología de los trastornos

psiquiátricos es, cada vez más, interpretada desde una perspectiva sistémica donde la función emerge de la interacción de diferentes redes (Nigg, 2012). Un trabajo reciente que cual utiliza imágenes de resonancia magnética de difusión de tensores, que permite evaluar la integridad de los haces neuronales en el cerebro, demostró la existencia de alteraciones en la materia blanca de la corteza orbitofrontal y alteraciones en las fibras en la corteza orbitofrontotemporal; observaciones que correlacionan con impulsividad y medidas de falta de atención (Konrad y *col.*, 2010; Konrad y *col.*, 2012) . Este trabajo demuestra que pacientes con TDAH presentan alteraciones estructurales entre la conexión de distintos circuitos, apoyando la idea de un trastorno neurobiológico complejo en el que participan muchos núcleos y áreas cerebrales diferentes.

Neuropsicología.

Si bien el numero de artículos científicos y estudios clínicos sobre TDAH han aumentado de manera exponencial en los últimos años, éstos han contribuido poco en mejorar los tratamientos, prevenir el surgimiento de los síntomas en poblaciones de riesgo o comprender los fundamentos básicos de esta enfermedad. Diferentes autores afirman que estos problemas se deben a que dichos estudios se basan, principalmente, en los síntomas, los cuales no siempre suelen estar relacionados con los mecanismos básicos del trastorno. Esta premisa parece evidente por el hecho de que los déficits del TDAH suelen ser compartidos con otros desórdenes psiquiátricos o que también suelen hallarse (aunque con menor intensidad) en personas que no cumplen con los criterios de diagnóstico del TDAH. Sin embargo, este es un problema común en el estudio de varios trastornos psiquiátricos. Debido a esto, hace algunos años se propuso el concepto de “endofenotipo” en enfermedades psiquiátricas; un endofenotipo es una característica heredable, relacionada a las bases genéticas de un trastorno. Diferenciar un endofenotipo de un síntoma es un paso crucial en comprender las características claves relacionadas con la causa de una enfermedad. El concepto de endofenotipo implica que este marcador de vulnerabilidad debe correlacionar con los síntomas, ayudar a identificar fenotipos mas específicos para la investigación genética o en otros factores etiológicos, ser heredados en familias, y estar presente en parientes no afectados. Algún marcador cognitivo puede aparecer en parientes

sanos, debido a que, presumiblemente, la combinación con otros factores ambientales en otros miembros de una familia causarían el desorden completo. Si estos marcadores no cumplen con estos parámetros probablemente solo representarían síntomas, pero no procesos causales (Nigg, 2005).

Basado en estos conceptos, varios autores han propuesto diferentes hipótesis o modelos neuropsicológicos acerca del origen causal de este desorden. Estas hipótesis se basan en desórdenes en procesos neurobiológicos y neuropsicológicos los cuales estarían relacionados con las bases neuronales de los comportamientos afectados en el TDAH y como estas disfunciones se configurarían para producir los síntomas característicos de esta condición psiquiátrica. Básicamente, los modelos causales del TDAH pueden ser clasificados en dos grandes grupos, los relacionadas con problemas cognitivos y déficits ejecutivos y los basados en problemas motivacionales y de recompensa (Sonuga-Barke, 2005) (Figura 2).

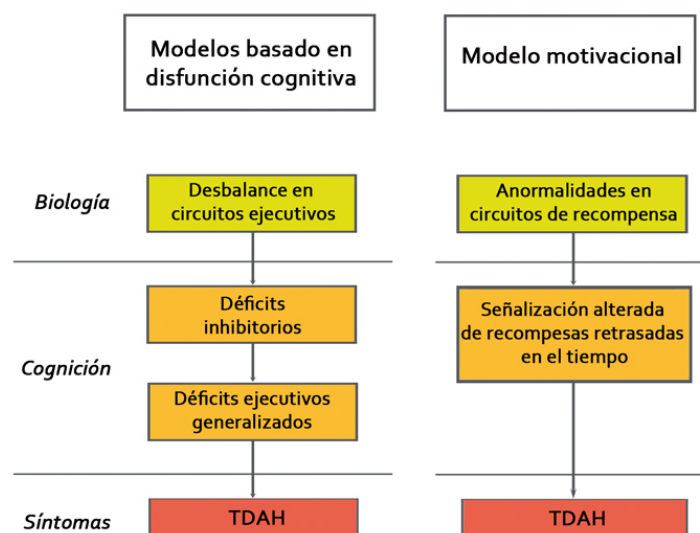


Figura 2: Modelos neuropsicológicos del Trastorno por déficit de atención con hiperactividad. Modificado de Sonuga-Barke, 2005.

Modelos basados en alteraciones en funciones ejecutivas.

Los modelos de TDAH basados en disfunciones cognitivas han sido considerados, durante mucho tiempo, las explicaciones mas útiles (y por ello dominantes) en la psicopatología de este desorden. Estos modelos sostienen que los síntomas del TDAH son el

resultado de una alteración en las funciones ejecutivas (Nigg y Casey, 2005). Las funciones ejecutivas representan una serie de procesos cognitivos relacionados con el planeamiento, ejecución y mantenimiento de una actividad, además de los procesos relacionados con el cambio y adaptación de dicha acción a las contingencias del medio o de las necesidades internas y externas. Estas incluyen atención, planeamiento, memoria de trabajo, plasticidad cognitiva e inhibición comportamental. Las funciones ejecutivas son procesos cognitivos de alto orden jerárquico, desde arriba hacia abajo, que permiten el mantenimiento y la flexibilidad necesaria para lograr una meta (Elliott, 2003). Estudios neuropsicológicos en niños con TDAH evidencian problemas en inhibición de respuestas, en memoria de trabajo y en flexibilidad de tareas (Willcutt y *col.*, 2005). Según estos estudios, uno de los déficits que aparece primero es el problema en la inhibición de respuestas (Willcutt y *col.*, 2005). La inhibición de respuestas se refiere a la habilidad de inhibir una respuesta prepotente o ya iniciada en favor de una alternativa más apropiada. Esta capacidad es considerada un pre requisito para el autocontrol, la regulación emocional y la flexibilidad cognitiva. Estos problemas en el control inhibitorio han sido relacionados con impulsividad e hiperactividad en niños con TDAH (Nigg, 2001). A nivel neuroanatómico, existen evidencias que indican que el control inhibitorio, memoria de trabajo y otras funciones ejecutivas son reguladas por circuitos que involucran a la DA, los que incluyen ganglios talámicos y basales que conectan de manera recíproca áreas corticales, especialmente CpF y corteza dorsolateral con el Str (Nieoullon y Coquerel, 2003; Sonuga-Barke, 2005)

Las funciones ejecutivas están también implicadas en procesos de estados de alerta y activación, que son requeridos para atender a las cambiantes necesidades de cada situación y al repertorio de acciones que se estén desarrollando en dicho momento (Sergeant, 2000). Estas funciones parecen estar también afectadas en el TDAH, sin embargo algunos autores no consideran a estos procesos como componentes de funciones ejecutivas (Nigg, 2005). El estado de alerta y la activación son mecanismos regulados por conexiones noradrenérgicas desde el Locus coeruleus (LC) hacia CpF (Posner y Petersen, 1990). El estado de alerta está relacionado con las etapas tempranas del procesamiento de la información y con la capacidad de responder a estímulos novedosos (Posner y Petersen, 1990; Nigg, 2005). Por otro lado, el concepto de activación hace referencia a la preparación para una respuesta y con la capacidad de estar listo para responder; a su vez la activación está relacionada al

concepto de atención sostenida, pero con énfasis en una preparación motora sostenida. A su vez la activación hace referencia a la capacidad motora de responder a un estímulo nuevo, pero no a la respuesta en sí (Nigg, 2005). Los tiempos de reacción más lentos en niños con TDAH parecen apoyar los modelos de déficits en activación, mientras que respuestas prematuras (relacionadas con impulsividad) estarían relacionadas con estados de alerta deficitarios. Si bien estos resultados podrían parecer contradictorios el estado de alerta y la activación son procesos que se complementan, pero a la vez son independientes. Finalmente, existen estudios que sugieren que el tiempo de respuesta en test neuropsicológicos específicos es menor en niños con TDAH y también en sus hermanos biológicos que no cumplen con el diagnóstico para esta enfermedad, con respecto a la media poblacional, sugiriendo que este marcador podría representar un verdadero endofenotipo de este trastorno (Nigg y col., 1997).

Modelos basados en mecanismos motivacionales o de recompensa.

Un segundo grupo de modelos, sostiene que los síntomas del TDAH son causados por déficits en mecanismos de recompensa (Johansen y col., 2002; Blum y col., 2008). Los mecanismos de recompensa producen su efecto al “reforzar” comportamientos adaptativos y producir la extinción de acciones no adaptativas (Blum y col., 2008). Para que este proceso sea eficiente, el estímulo y la recompensa deben ser cercanos en el tiempo. Sagvolden y col., (2005a) sostienen que los niños con TDAH tienden a presentar una respuesta menor a un estímulo reforzante, a menos que la recompensa sea presentada casi inmediatamente. Esto produce un gradiente anormal entre el reforzador y la recompensa, por lo que la recompensa se vuelve anormalmente débil en predecir un futuro reforzador cuando esta son distantes en el tiempo. Esto reduce el control ejercido por una recompensa futura sobre un comportamiento actual (Johansen y col., 2002; Sagvolden y col., 2005a). Los mecanismos de recompensa son mediados por la DA, especialmente por la vía mesocorticolímbica que proyecta desde el área tegmental ventral (VTA) hacia el Nucleus accumbens (NAc), Cpf y corteza orbitofrontal. Este modelo es apoyado por el hecho de que los niños con TDAH presentan sensibilidad a las demoras, problemas en tareas que se extienden en el tiempo y dificultades para esperar la finalización de actividades que resultarían motivacionales para otros niños (Tripp y Alsop, 2001; Luman y col., 2005). Por otro lado, estos niños tienden a

elegir recompensas menores inmediatas sobre recompensas mayores retrasadas en el tiempo (Antrop y col., 2006).

Complementariamente con los modelos motivacionales, otros autores han propuesto el surgimiento de un fenómeno que denominan “aversión al retraso”, definido por la incapacidad de obtener recompensas cuando estas son retrasadas en el tiempo, creando en el niño un estado emocional negativo durante actividades que se extienden por mucho tiempo (Solanto y col., 2001), por lo que buscan escapar o evitar este tipo de situaciones, lo que produce respuestas impulsivas (Sonuga-Barke, 2003). Además, este estado negativo puede manifestarse como inatención, sobreactividad e impulsividad (Sonuga-Barke y col., 2008).

Si bien los modelos cognitivos y los basados en mecanismos de recompensa han sido históricamente antagónicos, a nivel teórico y experimental estas no serían mutuamente excluyentes. Además, en la actualidad se acepta que el TDAH es un trastorno complejo y multifactorial, por lo que los modelos cognitivos y motivacionales pueden ser perfectamente complementarios en lugar de competitivos.

Por otro lado, las alteraciones en circuitos ejecutivos, modulados por DA mesocortical y en circuitos de recompensa regulados por DA mesolímbica, constituirían las bases neurobiológicas de procesos psicológicos disociables, los cuales producirían déficits ejecutivos y la aversión al retraso respectivamente (Sonuga-Barke, 2003, 2005). Finalmente, este modelo dual, también es apoyado por el hecho de que pacientes con TDAH presentan más frecuentemente problemas ejecutivos y de aversión al retraso al mismo tiempo que algunos de estos problemas de manera individual (Sonuga-Barke y col., 2008).

Modelos animales para el estudio del trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad.

Los modelos animales representan una metodología comúnmente utilizada en el estudio de enfermedades humanas. Específicamente, la utilización de modelos animales permite sortear muchos de los factores de confusión que limitan la investigación en humanos, como diversidad ambiental y variabilidad genética, además se pueden llevar a cabo intervenciones que no son posibles de realizar en los casos clínicos. Si bien el uso de

animales puede no siempre reflejar un desorden psiquiátrico, estos pueden proveer una visión del desorden que no puede ser obtenida a partir de estudios en humanos debido entre otros factores a las limitaciones de las técnicas disponibles (Robertson y Feng, 2011).

A pesar de que los primates no humanos presentan cerebros más similares a los de humanos, el uso de roedores como modelos de TDAH tienen la ventaja de ser genéticamente más homogéneos, ser más económicos, se puede disponer de mayor número de animales y el conocimiento sobre su neurobiología es mucho más extenso que el de los primates (Russell, 2011).

Un modelo animal debe recrear de la manera más fiel posible los síntomas encontrados en los casos clínicos. Sin embargo, los desórdenes psiquiátricos como el TDAH, son complejos y variables y no todos los pacientes presentan la misma sintomatología; además el TDAH puede ser subdividido en los tres subtipos antes mencionados. Teniendo en cuenta que para el diagnóstico clínico no siempre es necesario la presencia de todos los síntomas sumado a la gran variabilidad encontrada entre los pacientes, es poco realista esperar que un modelo animal presente o recree todos los síntomas posibles del humano (Wickens y col., 2011). Una aproximación más realista es modelar un comportamiento específico o una mutación genética, asociados con dicho desorden en un modelo individual. Estos modelos pueden ser luego usados para diseccionar la función específica de un gen, vía de señalización, subtipo celular o región cerebral afectada en un comportamiento particular.

Un modelo animal válido debe reproducir los síntomas clínicos observados en los pacientes, debe tener una etiología similar a la del trastorno en humanos y debe responder de manera similar a los tratamientos farmacológicos, siendo esta última característica muy útil para evaluar el uso potencial de nuevas terapias (Robertson y Feng, 2011).

Numerosos modelos animales de TDAH se han desarrollado desde hace más de 30 años. Estos modelos han sido generados mediante la inducción de lesiones con neurotoxinas, mediante la selección de animales con comportamientos específicos a partir de cepas particulares y a través de la generación de animales transgénicos (Tabla 5).

El primer modelo animal de TDAH y aún uno de los más utilizados, fue desarrollado mediante la destrucción selectiva de neuronas dopaminérgicas mediante la administración de la toxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) antes del día post-natal 5 (Shaywitz y col., 1976b; Shaywitz y col., 1976a). Estos animales lesionados presentan una gran reducción de los

Tabla 5: Modelos animales mas utilizados para el tratamiento del TDAH^{a,b}.

Roedor	Tipo	Impulsividad	Inatención	Espontánea	Hiperactividad	
					En ambiente conocido	Reversible mediante psicoestimulantes
WKY	seleccionada por endocría	Si	Si	No	Si	Si
NHE	seleccionada por endocría	No	Si	Si	No	Si
DAT-KO	ratón transgénico	Si ^{*c}	Si	Si	No	Si
DAT-KD	raton transgenico	NE	Si	Si	No	Si
Coloboma	hemizigota					
	espontaneo para SNAP-25	No	No	Si	NE	Si
Lesionado con 6OHDA	Lesionado químicamente	Si ^{*d}	No	No	Si	Si
Expuesto a PCB	expuesto a toxina	Si	No	NO	Si	Si
Expuesto a Plomo	expuesto a toxina	NE		Si	NE	Si
Expuesta a hipoxia	lesionado por falta de oxígeno	NE	Si	Si	No	Si
DAT-CI^e	Ratón transgénico	NE	Si	Si	No	Si

Modificado a partir de: ^aSagvolden y col., 2005a, ^bMill, 2007.

^cCarpenter y col., 2012, ^dAvale y col., 2004b ^eNapolitano y col., 2010. *Medida como falta de inhibición comportamental. NE: no evaluada

niveles de DA en Str, CpF, septum y amígdala, además de menores niveles de DAT y mayor cantidad del receptor de DA D4 y a su vez, mayores niveles de 5-HT y su transportador. Estos animales presentan hiperactividad a edades juveniles, la cual declina con la edad, problemas en aprendizaje espacial, menores niveles de ansiedad, pero no exhiben impulsividad (Russell, 2011). Estos animales reducen su actividad locomotora al ser tratados con psicoestimulantes (Shaywitz y col., 1976b) o con inhibidores de NAT (Russell, 2011). Si bien este modelo no puede proveer información acerca de la neurobiología de los problemas atencionales, ha sido ampliamente usado y muy valioso para estudiar los mecanismos que causan hiperactividad. A su vez, este modelo ha sido muy útil para descubrir nuevos componentes relacionados con el establecimiento de la hiperactividad en el TDAH, incluyendo el rol de la NA, 5-HT y D4 entre otros (van der Kooij y Glennon, 2007; Russell, 2011); (Avale y col., 2004b; Avale y col., 2004a).

Otros modelos basados en lesiones han sido propuestos, sin embargo estos no han recibido tanta atención. Entre estos, la anoxia durante el nacimiento aumenta el riesgo de padecer TDAH, además la carencia de oxígeno produce daños en diferentes áreas cerebrales. La falta de oxígeno en ratas de 2, 4 o 10 días ha sido propuesto como un modelo de TDAH; estos animales presentan mayores niveles de D1 y de VMAT-2; por otro lado presentan

alteraciones en la conectividad entre *Substancia nigra* (SN) y Str. Si bien este modelo estaría relacionado con la patología en humanos, solo exhiben hiperactividad, haciendo limitada su utilidad (Gramatte y Schmidt, 1986; Sagvolden y col., 2005a; van der Kooij y Glennon, 2007; Russell, 2011) . Por otro lado, el tratamiento con contaminantes que pueden encontrarse en el ambiente como plomo o bifenilos policlorados (PCB) han sido utilizados para el estudio de la etiología del TDAH. Animales expuestos a plomo presentan ataxia e hiperactividad, la cual es atenuada mediante el uso de ANF, además de presentar alteraciones en núcleos inervados por DA. Por otro lado la administración de PCB produce impulsividad e hiperactividad (Sagvolden y col., 2005b; van der Kooij y Glennon, 2007) .

Otros modelos fueron desarrollados partir de animales endocriados y seleccionados de acuerdo a fenotipos particulares. Uno de estos modelos lo representa la rata espontánea hipertensa (Spontaneously Hypertensive Rat, SHR) (Sagvolden y col., 1993b), la cual fue generada mediante endocría de ratas Wistar-Kyoto (WKY) con alta presión sistólica (Okamoto y Aoki, 1963) . Estas ratas presentan hiperactividad en ciertas situaciones comparadas con ratas Sprague Dawley o WKY, problemas en test de atención sostenida e impulsividad, medida tanto como sobrereactividad o pobre control de impulsos (Sagvolden y col., 1992; Sagvolden y col., 1993b) . Además, presentan déficits en paradigmas de aprendizaje operante cuando las recompensas son espaciadas en el tiempo, pero no cuando estas son presentadas inmediatamente (Sagvolden y col., 1993a). Por otro lado, estas ratas no disminuyen su actividad locomotora luego de la administración de psicoestimulantes, por lo que no serían útiles para el estudio de nuevos fármacos de este tipo, sin embargo constituyen una herramienta valiosa para evaluar terapias no basadas en DA (van der Kooij y Glennon, 2007). Estudios genéticos posteriores demostraron que las ratas SHR contienen una inserción de 160 pares de bases cerca del inicio de transcripción del DAT, similar a una mutación encontrada en humanos. Estas ratas presentan menores niveles de DAT durante el primer mes de edad y mayores niveles de los receptores D1, D2 y D5. El tratamiento con ANF produce una mayor liberación de DA en ratas SHR en relación a WKY, sin embargo presentan menor liberación de DA estímulo-evocada, sugiriendo la existencia de un sistema dopaminérgico hipofuncional (van der Kooij y Glennon, 2007). Por otra parte, la rata SHR ha sido de gran utilidad en el estudio del TDAH, sentando las bases de las hipótesis motivacionales relacionadas con problemas en el reforzamiento de aprendizajes cuando las

recompensas no son inmediatas, además, los problemas en la liberación de DA estímulo-dependientes han sido propuestos como un posible mecanismo molecular en la falta de reforzamiento de ciertos aprendizajes, especialmente en los retrasados en el tiempo (Sagvolden y *col.*, 1998; Sagvolden y *col.*, 2005a).

Otro modelo interesante es el de la rata de alta excitabilidad de Nápoles (Naples high-exitability, NHE), creada por endocría a partir de ratas seleccionadas por su elevada actividad locomotora en el laberinto de Lát (Sadile y *col.*, 1993). Estas ratas presentan elevados niveles de actividad locomotora, menor memoria de trabajo y problemas en test de atención sostenida, pero no impulsividad. Estudios anatómicos indican que estas ratas presentan mayores niveles de tirosina hidroxilasa (TH), mayores niveles del DAT y menor densidad de receptores D1 en núcleos que forman el circuito mesocortical, indicando la presencia de un sistema dopaminérgico hiperfuncional (Viggiano y *col.*, 2002; Sagvolden y *col.*, 2005b). Si bien estos animales representan un modelo útil, han recibido poca atención con respecto a las ratas SHR.

Varios ratones genéticamente modificados han sido propuestos como modelos de TDAH. Entre estos podemos citar a los ratones carentes del DAT (DAT-KO), los cuales presentan hiperactividad acompañada de niveles de DA cinco veces mayores a los normales, además, tienen problemas en pruebas de aprendizaje y para inhibir respuestas (Gainetdinov y *col.*, 1999; Gainetdinov y Caron, 2001). Los ratones DAT-KO reducen su actividad locomotora al ser tratados con ANF e inhibidores específicos de SERT, pero no de NAT (Gainetdinov y *col.*, 1999). A su vez éstos presentan menores niveles de D1 y de liberación de DA dependiente de potenciales de acción, lo cual lleva a una inhibición en la potenciación a largo plazo (long term potentiation. LTP) (Gainetdinov y Caron, 2001), una forma de plasticidad relacionada con el aprendizaje y que sería necesaria para el reforzamiento de comportamientos adaptativos. Este modelo tiene la desventaja de no ser útil para probar drogas que actúan a través del DAT, pero provee información sobre las consecuencias de la disfunción de dicho transportador. Además, es criticado porque la falta total del DAT nunca ha sido observado en humanos. Esta última observación puede ser sorteada mediante el uso de ratones genéticamente modificados que tienen una reducción del 90% de los niveles de DAT, pero conservan un 10% totalmente funcional, presentando estos ratones un aumento de un 70% en los niveles de DA extracelular. Estos ratones exhiben hiperactividad, la cual

puede ser reducida por el uso de psicoestimulantes y en inhibición de respuestas (Zhuang y *col.*, 2001). Sin embargo, estos presentan menor distractibilidad (una medida de inatención) y un patrón complejo y rígido de conductas estereotipadas de higiene, por lo que muchos autores prefieren sugerirlo como un modelo útil para trastornos obsesivo-compulsivos o síndrome de Tourette (Pecina y *col.*, 2003; Berridge y *col.*, 2005).

Recientemente, ha sido propuesto como un posible modelo de TDAH un ratón genéticamente modificado que presenta tres mutaciones puntuales en el gen que codifica para el DAT, que lo hace insensible a la COC (Chen y *col.*, 2005; Napolitano y *col.*, 2010). Estos ratones presentan hiperactividad, la cual es revertida mediante el uso de psicoestimulantes e inhibidores específicos de DAT, como nomifensina además de ser parcialmente atenuada mediante inhibidores de NAT. Estos animales presentan menores niveles totales de DA y una elevada tasa metabólica de ésta; por otro lado, el tratamiento con psicoestimulantes produce menores aumentos en los niveles extracelulares de DA con respecto a los controles. De manera interesante, estos ratones presentan la particularidad de inhibir su actividad locomotora al ser tratados con agonistas del receptor D1, relacionada con una señalización intracelular aberrante encontrada en este ratón (Napolitano y *col.*, 2010). Si bien este podría ser un modelo útil de TDAH, la impulsividad y los problemas atencionales aun no han sido estudiados en estos ratones.

Además de estos, existen en la literatura un gran número de otros modelos (Viggiano y *col.*, 2003a; Sagvolden y *col.*, 2005b; Russell, 2011; Tripp y Wickens, 2012) (Robertson y Feng, 2011), sin embargo la discusión y descripción de estos escapan al alcance de esta tesis.

En síntesis, los modelos animales más usados y aceptados para el estudio del TDAH presentan alteraciones en circuitos dopaminérgicos. Esto, sumado a la neuropsicofarmacología del TDAH, a datos genéticos y a los estudios de neuroimágenes previamente mencionados, señalan a la DA como uno de los principales neurotransmisores implicados en la patofisiología de este trastorno.

LA DOPAMINA

Generalidades

El neurotransmisor DA (amino-3.hidroxitriptamina), fue inicialmente identificado como un precursor de la síntesis de adrenalina y NA a partir de l-tirosina. Sin embargo los trabajos de Carlson y colaboradores (Carlsson y *col.*, 1957; Carlsson y *col.*, 1958), en la segunda mitad de la década de 1950 demostraron que DA no era solo un intermediario metabólico en la síntesis de las catecolaminas sino que podía funcionar como un neurotransmisor por si mismo. En la primera década después de su descubrimiento como neurotransmisor, la DA recibió muy poco interés comparada con otros neurotransmisores clásicos como NA, 5-HT y acetilcolina, sin embargo en el año 1967, Cotzias y col (1967) desarrollaron una dosis clínica exitosa de dihidroxifenilalanina (l-DOPA), que es convertida en DA en el cerebro, para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, la cual se usa hasta la actualidad (Cotzias y *col.*, 1967). A partir de este hecho, el numero de publicaciones y de grupos de investigación dedicados a estudiar a DA se disparó de manera considerable (Bjorklund y Dunnett, 2007a), representando el neurotransmisor con el mayor número de publicaciones (según datos de Pubmed, Biblioteca Nacional de Medicina, Instituto Nacional de Salud, NLM-NIH, Bethesda, MD, Estados Unidos).

La DA es un neurotransmisor altamente conservado, presente en invertebrados como *Drosophila melanogaster* o *Caenorhabditis elegans*, así como en todos los vertebrados; además, representa el neurotransmisor con mayor número de inervaciones en todo el sistema nervioso central de mamíferos. No sólo esta presente en el sistema nervioso central, sino que también participa en una gran cantidad de funciones periféricas, que incluyen olfacción, procesos retinales, regulación hormonal, funciones cardiovasculares, control de la presión sanguínea, regulación simpática, sistema inmune y en funciones renales, entre otras (Carlsson, 2001; Iversen y Iversen, 2007).

A nivel central, la DA participa en una gran gama de fenómenos que incluyen procesos básicos, como regulación de la función motora y procesos basados en sistemas de recompensa como búsqueda de alimento, agua y conductas copulatorias (Bjorklund y Dunnett, 2007a; Salamone y Correa, 2012). Además, participa en varias funciones y procesos de orden superior como memoria de trabajo, aprendizaje y memoria, atención, toma de

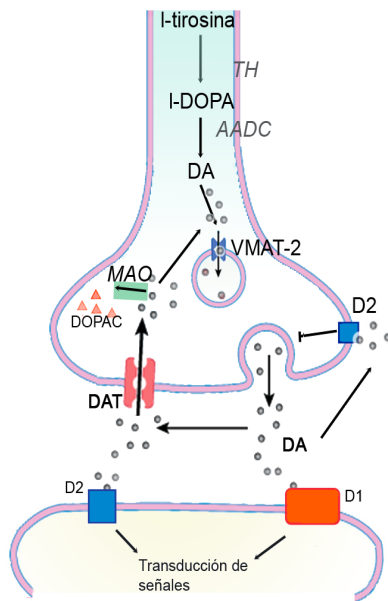


Figura 3: Mecanismos básicos de la transmisión sináptica dopaminérgica, ejemplificando (a) síntesis, (b) empaquetamiento en la vesícula sináptica, (c) liberación, (d) transducción de señales, (e) recaptación y (f) metabolismo. TH; tirosina hidroxilasa, AADC: decarboxilasa de aminoácido aromáticos. VMAT-2: transportador de monoaminas 2. DAT: transportador de DA. DOPAC: ácido dihidroxifenil acético. MAO: monoamino oxidasa.

decisiones y en estados afectivos (Nieoullon, 2002). Todos estos procesos implican el funcionamiento de un gran número de circuitos y núcleos neuronales, y de la participación de una amplia gama de receptores celulares, vías de señalización y del funcionamiento de múltiples moléculas relacionadas con la normal transmisión sináptica. (Los eventos básicos de la señalización sináptica dopaminérgica se ejemplifican en la Figura 3).

Debido a que la DA está involucrada en una serie de funciones críticas, no es sorprendente que múltiples desordenes en humanos estén relacionados con disfunciones dopaminérgicas (Marsden, 2006). La pérdida de inervación dopaminérgica en Str, debido a la muerte selectiva de neuronas de la SN representa la causa de la pérdida del control motor en la enfermedad de Parkinson (Carlsson, 2002). La esquizofrenia se ha relacionado con niveles reducidos de DA en CpF y con una desinhibición en la liberación de ésta en Str, además, la mayoría de los fármacos antipsicóticos usados para tratar este trastorno actúan a través de los receptores de DA D2 o D4 (Seeman, 1987; Laruelle y *col.*, 1999). Diversos estudios han relacionado una anormal regulación en la liberación y recaptación de DA en el síndrome de Tourette (Mink, 2006). En la enfermedad de Huntington, la selectiva vulnerabilidad de neuronas del Str, donde se concentra la mayor cantidad de inervaciones dopaminérgicas, sugiere un importante rol de la DA en la patogénesis de este desorden (Jakel y Maragos, 2000). Por otro lado, una anormal plasticidad en mecanismos de recompensa mediados por DA, han sido fuertemente asociados en procesos de adicción y abuso de drogas, además, es

conocido que todas las drogas de abuso aumentan de manera directa o indirecta la liberación de DA (Nestler, 2005; Sulzer, 2011). A su vez, DA se ha relacionado de manera más débil o secundaria con trastornos como depresión, trastorno bipolar, disquinesias y con varios trastornos somáticos como hipertensión y problemas en la función renal (Nestler y Carlezon, 2006; Iversen y Iversen, 2007). Finalmente, como se mencionó en el capítulo anterior, los problemas en la función normal dopaminérgica constituiría una de las bases neurobiológicas del TDAH.

Neuroanatomía de los circuitos dopaminérgicos.

Características de las áreas que producen y liberan dopamina.

Los cuerpos celulares de las neuronas dopaminérgicas están presentes en casi toda la parte ventral del cerebro, donde se pueden encontrar neuronas aisladas, pero la gran mayoría se ubican agrupados en unidades anatómicas y funcionales. Originalmente se identificaron doce grupos de neuronas con la capacidad de producir catecolaminas denominadas con la letra A y numeradas desde A1 a A12 en sentido caudal-rostral, desde la *médula oblongata* hasta el hipocampo; algunos años después se añadieron cinco grupos más, designados desde A13 hasta A17, ubicados en el diencefalo, bulbo olfatorio y retina. Esta denominación ha sido muy útil y se sigue utilizando debido a que estos grupos muchas veces no se encuentran confinados en una única y definida estructura anatómica; además, debido a que la localización de estos grupos varía considerablemente entre distintas especies de mamíferos, esta nomenclatura es muy conveniente cuando se comparan datos obtenidos de distintas especies (Bjorklund y Dunnett, 2007b). Los grupos identificados como neuronas dopaminérgicas mediante la detección de la presencia de la enzima TH corresponden a los denominados desde A8 a A17 (Haber y col., 1999). Varios de estos grupos, como A11 a A15 carecen de niveles detectables de DA y de otras proteínas necesarias para la biosíntesis y liberación de este neurotransmisor (Weihe y col., 2006); incluso algunos de estos como A12 suelen encontrarse prácticamente ausente en roedores, sin embargo, estos suelen tener funciones importantes durante la embriogénesis y etapas tempranas del desarrollo del cerebro. Las neuronas del grupo A16, ubicadas en el bulbo olfatorio presentan altos niveles de DA, pero carecen del transportador VMAT-2, necesario para el almacenamiento y

liberación a través de vesículas sinápticas, sin embargo, estas liberan DA al espacio extracelular, por lo que lo harían a través de un mecanismo no vesicular (Bjorklund y Dunnett, 2007b; Cave y Baker, 2009).

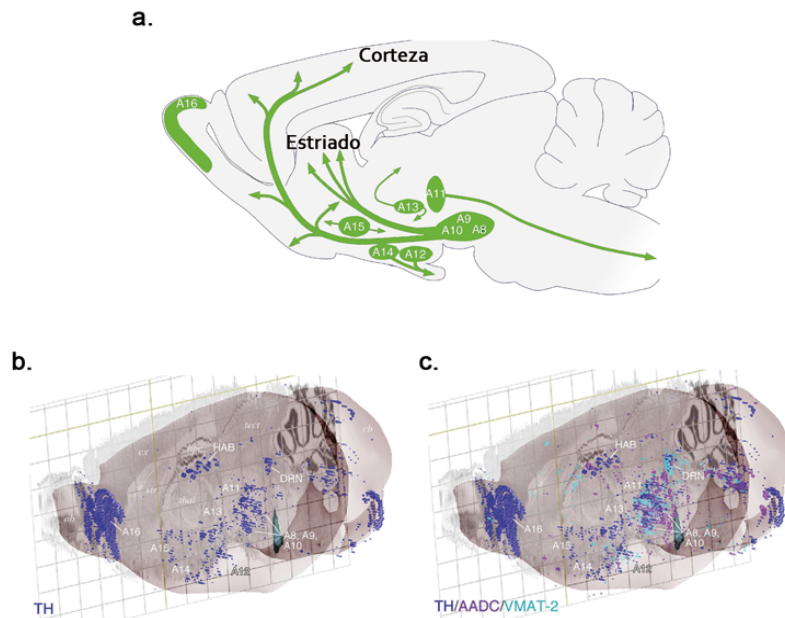


Figura 4: Ubicación de áreas cerebrales que pueden producir dopamina (DA). a. Núcleos dopaminérgicos identificados por la presencia de la enzima TH. b. y c. Reconstrucción tridimensional de áreas TH positivas, sin embargo, como se observa en (c), la expresión de AADC Y VMAT-2 necesarias para la producción y almacenamiento de la DA en vesículas sinápticas se encuentra restringidas a los núcleos A8-A10, que corresponden al Área retrorubral, Sustancia nigra pars compacta y área tegmental ventral respectivamente. Modificado de Bjorklund y Dunnett, 2007b. AADC: decarboxilasa de aminoácidos aromáticos. VMAT-2: transportador vesicular de monoaminas 2.

Los grupos A8–A10 representan las áreas dopaminérgicas más importantes, tanto por el número de neuronas y por las áreas a las que estas proyectan, como por su función biológica, siendo estos núcleos los responsables de la modulación de casi todos los procesos en los que DA participa a nivel central (Nicola y col., 2000; Tritsch y Sabatini, 2012). El grupo de neuronas A9 corresponde a la *Sustancia nigra pars compacta* (SNc), mientras que A8 corresponde al Área retrorubral, que forma una extensión caudal y dorsal de la SNc; el grupo de neuronas A10 corresponde al VTA (German y Manaye, 1993) (Figura 4).

Las neuronas dopaminérgicas proyectan sus axones hacia Str y áreas corticales y límbicas. Esto ha dado lugar a una clasificación de las neuronas dopaminérgica en dos subtipos, neuronas de la SNc que proyectan hacia el Str a través de la vía mesoestriatal (MS) o nigroestriatal y el grupo de neuronas del VTA, las cuales envían sus aferencias hacia áreas

corticales y límbicas por medio de las vía mesocortical (MC) y mesolímbica (ML) respectivamente (Bjorklund y Dunnett, 2007b). Sin embargo, esto representa una sobresimplificación ya que la SNc no solo envía axones hacia Str sino también hacia áreas corticales y límbicas; por otro lado el VTA inerva neuronas tanto corticolímbicas como una gran parte del Str medial y ventral, especialmente NAc. Las neuronas localizadas en A8 envían axones tanto a áreas estriatales, corticales y límbicas (Bjorklund y Dunnett, 2007b). (Figura 5).

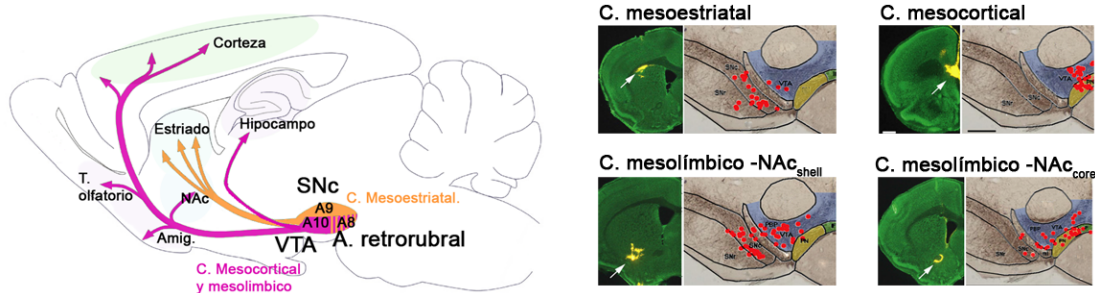


Figura 5: Circuitos dopaminérgicos mesoestriatal, mesocortical y mesolímbico. En la imagen de la izquierda se observan un diagrama de las aferencias de cada circuito. En el panel de la derecha se observan imágenes de la ubicación de los somas dopaminérgicos y las áreas hacia donde éstos proyectan sus axones. Modificado a partir de Bjorklund y Dunnett, 2007b y Lammel y col., 2008.

El número de neuronas dopaminérgicas en el mesencéfalo es aproximadamente de 30.000 en ratones y 45.000 en ratas, estando cerca de la mitad de estas ubicadas en la SNc; este número aumenta desde aproximadamente 200.000 en primates no humanos y hasta casi 600.000 en humanos, en los cuales más del 70% de éstas corresponden a neuronas de la SNc (Nelson y col., 1996). Esto se correlaciona con la expansión de los territorios con innervación dopaminérgica, particularmente en la neocorteza que es extensamente más innervada en primates que en roedores. En roedores, la innervación dopaminérgica cortical está confinada a áreas de la CpF, corteza frontal, cíngula y entorinal, mientras que en humanos la innervación dopaminérgica cubre todo el manto cortical. Esta innervación de la corteza proviene de los tres núcleos dopaminérgicos mesencefálicos (A8-A10) (Williams y Goldman-Rakic, 1998).

Basado en su conectividad y en sus características morfológicas, las neuronas dopaminérgicas pueden ser separadas en una capa dorsal y otra ventral. La capa dorsal incluye células localizadas en la parte dorsal del VTA y la SNc y células del A8, que inervan

NAc, áreas límbicas y corticales y algunos sectores del Str. Estas son células redondas y fusiformes y se caracterizan por expresar la proteína calbindina y presentar bajos niveles de DAT. Por otro lado la capa ventral de neuronas dopaminérgicas esta constituida por neuronas angulosas, densamente compactadas, ubicadas en la parte ventral del VTA y SNc; estas contiene altos niveles del DAT y del canal de corrientes rectificantes de entrada de K^+ regulado por proteína G tipo 2 (GIRK2), pero son calbindina negativas. Estas neuronas proyectan casi exclusivamente hacia el Str donde inervan a casi toda la estructura (Bjorklund y Dunnett, 2007b).

Si bien la localización de las neuronas que conforman los circuitos MS, ML y MC no tienen una delimitación anatómica clara y sus células de origen se encuentran mezcladas en SNc-VTA, estas tres vías se encuentran anatómica y funcionalmente diferenciadas. Estudios de marcado retrogrado indican que las neuronas dopaminérgica que proyectan hacia Str rara vez (entre el 1 y 5 %) envían colaterales hacia áreas extraestriatales; de la misma manera las aferencias colaterales provenientes de neuronas ML o MC hacia Str son igualmente escasas (Loughlin y Fallon, 1984; Gauthier y *col.*, 1999).

Todos estos datos indican que la segregación anatómica entre un sistema de proyección nigral y del VTA no es real. Tanto en roedores como en primates las aferencias que llegan a Str provienen tanto de SNc, del área lateral y capa ventral del VTA y A8, por otro lado las neuronas que proyectan hacia NAc y áreas corticales y límbicas, se originan tanto en VTA como en la capa dorsal de la SNc y del grupo A8 (Bjorklund y Dunnett, 2007b; Lammel y *col.*, 2008).

Toda esta información señala que la red neuronal dopaminérgica originada en el mesencéfalo es altamente compleja y que las separaciones en circuitos discretos no es real, sin embargo, el uso de los términos MS, MC y ML aun son ampliamente utilizados debido a que esta denominación y demarcación de circuitos es útil ya que permite disecarlos para estudiarlos con una base anatómica relativamente valida y estandarizada, lo que facilita el diseño de los experimentos y la comparación con otros estudios.

Características de los núcleos que reciben inervación dopaminérgica

Gran cantidad de los mecanismos mediados por DA son llevados a cabo mediante la modulación de la función del Str y del NAc (Figura 6a). Este último suele considerarse una extensión ventral del primero, debido a la ausencia de una delimitación anatómica clara y de

que comparten algunas funciones. Esencialmente todas las funciones atribuidas a estos núcleos son adscriptas a la rica innervación dopaminérgica que reciben, sin embargo, ambos son blancos de activación a través de aferencias que liberan glutamato (GLU). El NAc recibe innervación excitatoria de áreas límbicas como CpF, hipocampo y amígdala, mientras que el Str es blanco de terminales excitatorios provenientes de otras áreas corticales y talámicas (Nicola y *col.*, 2000).

El Str es una estructura anatómica continua y altamente uniforme, formada en un 90-95 % de neuronas que producen ácido- γ -aminobutírico (GABA) como neurotransmisor, las cuales reciben el nombre de neuronas espinosas medianas (NSM) (Surmeier y *col.*, 2011). Además, presenta tres tipos diferentes de interneuronas que utilizan acetilcolina, GABA u óxido nítrico/somatostatina como neurotransmisores; estas representan entre un 1-3% del total neuronal de esta estructura (Figura 6b).

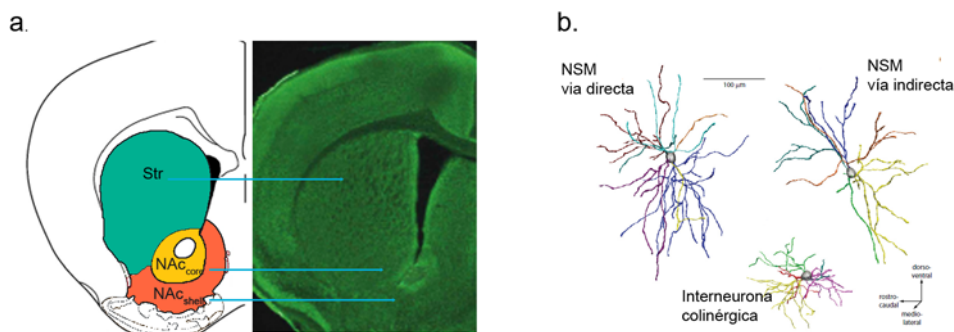


Figura 6: a. Ubicación del estriado (Str) y del subdivisiones del Nucleus accumbens (NAc) “core” y “shell” (NAc_{core} y NAc_{shell}). **b. Reconstrucción tridimensional de los diferentes tipos de neuronas espinosas medianas (NSM) del Str y el NAc y de interneuronas colinérgicas.** Modificado a partir de Lammel y *col.*, 2008 y Surmeier y *col.*, 2011.

El Str participa principalmente en mecanismos de modulación de la locomoción pero también se encuentra relacionado con funciones superiores que incluyen aprendizaje y memoria (Shepherd, 2013). El Str se ha relacionado con diferentes tipos de aprendizajes, incluyendo aprendizaje procedimentales y espaciales (Devan y White, 1999; White y McDonald, 2002) y en memoria de trabajo y funciones ejecutivas (Voytek y Knight, 2010) .

En base a su composición bioquímica y a su conectividad, las neuronas del Str pueden ser divididas en dos grupos. Las primeras que forman la llamada vía directa, proyectan hacia *Substancia nigra pars reticulata* (SNr) y hacia el segmento interno del *globus pallidus* (GPi). El otro grupo, que conforma la vía indirecta, envía sus proyecciones hacia el segmento externo del *globus pallidus* (GPe). La vía directa puede luego regular la función cortical a través de un circuito que incluye GPi y tálamo. Por otro lado, en la vía indirecta, el GPe envía aferencias hacia el núcleo subtalámico el cual puede inervar al GPi y a la SNr. Por otro lado, las conexiones recíprocas provenientes de CpF hacia Str comprenden vías directas, es decir sin la participación de otros núcleos cerebrales (Bolam y col., 2000; Shepherd, 2013) (Figura 7).

Las neuronas de la vía directa expresan gran cantidad de D1 y de sustancia P; una proporción de éstas expresa también niveles considerables de D3. Las neuronas de la vía indirecta, por otro lado, expresan a D2 y encefalina (Surmeier y col., 1996; Nicola y col., 2000; Surmeier y col., 2007). Además, una subpoblación de aproximadamente el 25% de las neuronas estriatales expresan tanto D1 como D2 (Surmeier y col., 1996). Los otros receptores dopaminérgicos (D4 y D5) se encuentran en muy bajo nivel en esta estructura. En interneuronas colinérgicas del Str es común encontrar niveles considerables de D2 y D5 (Nicola y col., 2000).

De manera similar al Str, el Nac, esta compuesto casi en su totalidad de NSM gabaérgicas (>95 %) y de un pequeño número de interneuronas colinérgicas (Meredith, 1999). Evidencias anatómicas, neuroquímicas y funcionales justifican la división de este en

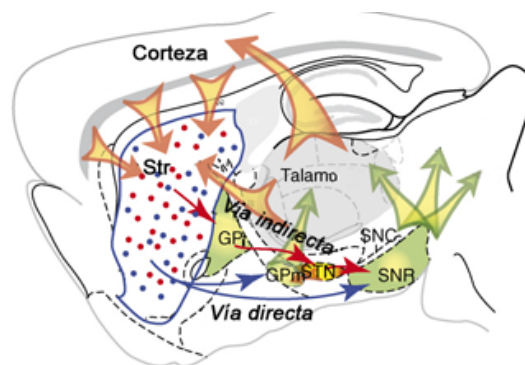


Figura 7: Conectividad de neuronas del estriado (Str). GPi segmento interno del globus pallidus. GPe segmento externo del globus pallidus. SNr, sustancia nigra pars reticulata, SNc sustancia nigra pars compacta. Modificado de Surmeier y col., 2007.

una área rostral denominado polo, y dos áreas, una dorso-caudal denominado núcleo o “core” (NAC_{core}) y una ventro-caudal llamada corteza o “shell” ($\text{NAC}_{\text{shell}}$). No existe una delimitación anatómica entre NAC_{core} y Str, formando una estructura continua, mientras que el límite entre NAC_{core} y $\text{NAC}_{\text{shell}}$ es fácilmente observable a través de tinciones inmunohistoquímicas contra sustancia P o encefalina (Floresco, 2007). La región del “core” muestra un patrón de conexión similar al del Str, proyectando hacia regiones del GPi (que luego a partir de este circuito pueden arribar hacia áreas corticales del lóbulo frontal) y SNr. Por otro lado, la región del “shell” presenta un patrón de conexión más complejo enviando axones hacia el VTA, hipocampo, GP y amígdala extendida (Shirayama y Chaki, 2006). La función del NAc es regulada, además, por aferencias de la corteza y del hipocampo. La región del NAC_{core} recibe aferencias desde el hipocampo a través del subvulvum dorsal, mientras que el $\text{NAC}_{\text{shell}}$ recibe aferencias de la parte ventral del hipocampo. Esta organización topográfica es similar en las aferencias provenientes de amígdala y CpF, donde los axones de áreas ventrales arriban hacia el $\text{NAC}_{\text{shell}}$, mientras que las más caudales lo hacen principalmente con el NAC_{core} (Zahm, 2000; Floresco, 2007). Además, proyecciones provenientes de la CpF arriban a ambos segmentos del NAc, mientras que axones que se originan en CpF orbital preferentemente conectan con NAC_{core} (Floresco y *col.*, 2006).

Además, el NAc recibe NA desde el LC y 5-HT desde el segmento dorsal del Rafe, lo que indica la gran complejidad e importancia de esta estructura (Shirayama y Chaki, 2006).

El NAc participa principalmente en comportamientos y aprendizajes motivados (Salamone y Correa, 2012), y es crucial en los mecanismos relacionados con los efectos reforzantes de las drogas de abuso (Everitt y Robbins, 2005). El $\text{NAC}_{\text{shell}}$ se ha relacionado con la expresión de comportamientos incondicionados como comportamientos maternos (Li y Fleming, 2003) y búsqueda de alimentos (Reynolds y Berridge, 2002), mientras que el NAC_{core} se encuentra relacionado con la adquisición de respuestas condicionadas e incondicionadas (Corbit y *col.*, 2001; Floresco y *col.*, 2008)

Los receptores tanto D1 como D2 se encuentran distribuidos de manera uniforme en ambas regiones del NAc. La expresión de los receptores D1 suele encontrarse acoplada a sustancia P y dinorfina, mientras que la de D2 a encefalina (Nicola y *col.*, 2000), no encontrándose neuronas que coexpresen ambos receptores (Nicola y *col.*, 2000; Groenewegen y Trimble, 2007). Por otro lado, el $\text{NAC}_{\text{shell}}$ representa el área cerebral con

mayor cantidad de expresión del receptor D3, estando este totalmente ausente en NAc_{core}, representando este receptor, junto con la ausencia del sensor de Ca²⁺ calbindina-D28K (altamente expresado en el core), una de las mejores distinciones histoquímicas entre estas dos secciones de este núcleo (Meredith y col., 1996; Joyce y Gurevich, 1999). Los receptores dopaminérgicos restantes (D4 y D5), no se encuentran en neuronas del NAc, sin embargo, D5 suele estar presente en alguna subpoblación de interneuronas (Nicola y col., 2000).

Biosíntesis de la dopamina.

La DA es sintetizada a partir del aminoácido l-tirosina circulante en el plasma sanguíneo, el cual atraviesa la barrera hematoencefálica y posteriormente es translocado desde el fluido extracelular hacia el interior de las neuronas y la glía, a través de transportadores de aminoácidos de alta y baja afinidad (Elsworth y Roth, 1997). En las células del sistema nervioso central, más del 90% de la l-tirosina es utilizada para la síntesis de proteínas, mientras que la parte restante es empleada para la producción de DA y NA. Una vez dentro del citoplasma de las neuronas dopaminérgicas o noradrenérgicas, la l-tirosina es convertida en l-DOPA en una reacción catalizada por la enzima TH, siendo este, el paso limitante en la síntesis de las catecolaminas. Esta reacción necesita de la presencia del co-factor tetrahidrobiopterina (BH₄), el cual es convertido en dihidrobiopterina (BH₂) durante la síntesis de l-DOPA. La BH₂ es posteriormente reciclada a BH₄ por la acción de la enzima dihidrobiopterina reductasa. A continuación, l-DOPA es convertida en DA mediante la acción de una decarboxilasa de l-aminoácidos aromáticos (AADC) en una reacción muy rápida, por

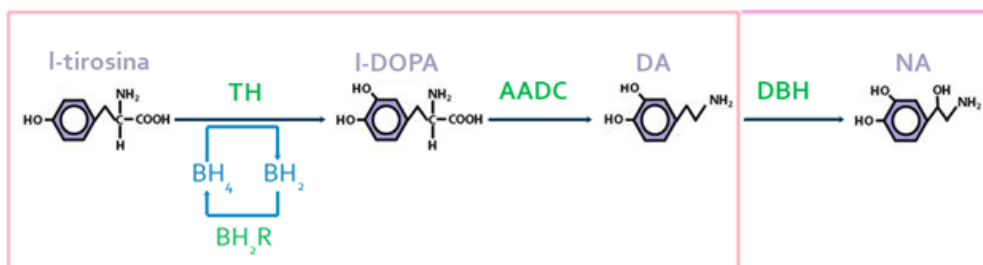


Figura 8: Biosíntesis de la dopamina (DA). DA es producida a partir de l-tirosina en el interior de las neuronas dopaminérgicas; en neuronas noradrenérgicas, esta puede ser convertida en noradrenalina. TH: tirosina hidroxilasa, BH₄: tetrahidrobiopterina. BH₂: dihidrobiopterina. BH₂R: dihidrobiopterina reductasa. AADC: decarboxilasa de aminoácidos aromáticos. DBH: dopamina-beta-hidroxilasa. Modificado de Laatikainen y col., 2013.

lo que en condiciones normales los niveles de L-DOPA son casi indetectables (Elsworth y Roth, 1997). En neuronas noradrenérgicas, la DA es posteriormente oxidada a NA por medio de la enzima dopamina- β -hidroxilasa. (Figura 8) Una vez sintetizada, la DA es transportada al interior de las vesículas sinápticas por medio del transportador dependiente de protones VMAT-2, donde es almacenada hasta que es liberada en la cavidad sináptica.

Regulación de la enzima Tirosina hidroxilasa

Debido a la gran importancia de los procesos en los que la DA participa, la síntesis de esta es un mecanismo altamente regulado. El control de la síntesis de DA es realizado a través de la modulación de la función de la enzima TH por medio de mecanismos que incluyen, el control de su expresión, de la cinética de reacción mediante la interacción o competencia con sus sustratos o productos, y por la modulación de su eficiencia a través de modificaciones postraduccionales.

La actividad puede ser modulada a mediano o largo plazo mediante la regulación de la expresión génica, que incluye la estabilidad de la enzima, la regulación transcripcional, la estabilidad del ácido ribonucleico mensajero (ARNm), el “splicing” alternativo del ARNm y regulación traduccional; o a corto plazo mediante inhibición por retroalimentación, regulación alostérica y fosforilación (Dunkley y *col.*, 2004).

Los niveles de expresión de TH a partir de síntesis de novo son regulados principalmente mediante la traducción de ARNm a proteína y no por el nivel de transcripción de ADN a ARN. Si bien los niveles de ARNm suelen correlacionar con los niveles de actividad de TH este no sería un buen indicador de los niveles de ésta, ya que muchos estudios han demostrado que aumentos en los niveles de ARNm de TH no están acompañados en aumentos en la proteína en la misma proporción, indicando que la regulación de los niveles de esta enzima es controlada a niveles traduccionales o postraduccionales, siendo la regulación a nivel génico menos importante (Kumer y Vrana, 1996; Pan y *col.*, 2006).

En el corto o mediano plazo la función de TH, es regulada mediante fosforilación por una amplia gama de proteínas quinasas. La TH es un homotetrámero con el extremo carboxilo terminal (C-terminal) catalítico y el amino terminal (N-terminal) regulatorio, el cual contiene cuatro serinas (Ser) 8, 19, 31 y 40 que son fosforiladas *in vivo*; además se han citado

otras dos, Ser153 y Ser403, pero no se ha demostrado concluyentemente que estas sean fosforiladas *in vivo*. En condiciones normales, menos del 5% de la TH se encuentra fosforilada y estímulos tales como despolarización neuronal, aumentan sus niveles a aproximadamente un 10%. La Ser19 suele encontrarse fosforilada entre un 5 y 30% en condiciones de reposo y puede aumentar en un rango de entre un 20 y 70% luego de la despolarización, de la misma forma los niveles de fosforilación de TH en la Ser31 pueden aumentar del 10% al 20%, mientras que la Ser8 suele encontrarse fosforilada en un 8% aproximadamente (Dunkley y *col.*, 2004) (Figura 9).

La TH es fosforilada en la Ser8 *in vivo* y en cultivo de células PC12 por la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK, extracelular signal-regulated kinase), sin embargo no existen evidencias de que esta fosforilación afecte la actividad de TH ni la síntesis de catecolaminas (Dunkley y *col.*, 2004).

La enzima TH es fosforilada en la Ser19, principalmente por la quinasa activada por calcio (Ca^{2+}) y calmodulina 2 (CaMPK-2) en respuesta a estímulos como, despolarización, altos niveles de Ca^{2+} o entrada K^+ , siendo esta última, la principal responsable de la incorporación de fosfatos en este aminoácido; además, se ha señalado a la proteína quinasa activada por MAPK-2 (MAPKAPK2) y a la proteína regulada y activada por p38 (PRAK), especialmente activas en situaciones de estrés celular, como agentes que fosforilan a la TH en este residuo (Dunkley y *col.*, 2004).

La enzima TH es fosforilada en la Ser31 por dos quinasas muy importantes, ERK1/2 y por la quinasa dependiente de ciclina 5 (CDK5) (Dunkley y *col.*, 2004; Moy y Tsai, 2004) .

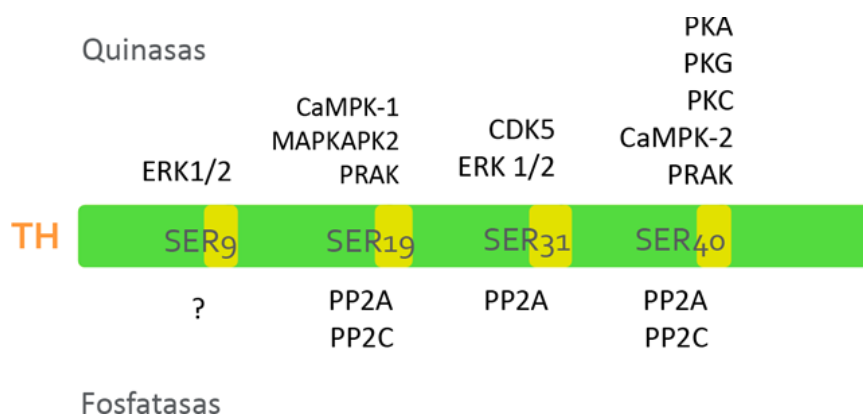


Figura 9: Quinasas y fosfatasas que pueden regular a tirosina hidroxilasa (TH). Modificado de Dunkley y *col.*, 2004.

ERK1/2 fosforila a TH en respuesta a una serie de estímulos como despolarización por KCl, aumento de Ca^{2+} , aumento de los niveles del segundo mensajero adenosina monofosfato cíclico (AMPC) y en respuesta al factor de crecimiento nervioso (NGF), estos mecanismos son mediados a través de la activación de ERK por la proteína quinasa C (PKC). Además, la Ser31 puede ser fosforilada por CDK5, luego de la llegada de los potenciales de acción. Si bien existe una señalización cruzada entre ERK y CDK5, la acción de estas quinasas sobre TH sería independiente una de otra (Kansy y *col.*, 2004). Por otro lado, se ha señalado que los niveles de fosforilación de TH en la Ser31 son afectados por la acción de COC o ANF, dependiendo del tiempo o forma de administración, donde tratamientos agudos, producen una disminución en los niveles de TH fosforilada en la Ser31 (también observado en Ser19 y 40) y una menor producción de l-DOPA (Jedynak y *col.*, 2002); sin embargo, los tratamientos crónicos o los paradigmas donde ratas o ratones pueden autoadministrarse COC o ANF libremente, producen un aumento en los niveles de incorporación de fosfatos en la Ser31 (Kansy y *col.*, 2004). En el primer caso, la disminución de los niveles de fosforilación en la Ser31 sería una consecuencia aguda de la alteración en la homeostasis dopaminérgica, mientras que el aumento observado luego de tratamientos crónicos con psicoestimulantes sería el resultado de que éstos producen un aumento permanente en los niveles de actividad de CDK5 (Bibb y *col.*, 2001).

Por otra parte, la Ser40 de TH es fosforilada por la proteína quinasa A (PKA), mediados por aumentos de AMPC en respuesta a la activación de los receptores D2, y por la proteína quinasa G en respuesta a óxido nítrico y por aumentos de guanina monofosfato cíclica; también puede ser fosforilada directa o indirectamente por PKC o como consecuencia de estrés celular a través de MPAPKAK y PRAK. Aparentemente, solo PKA participaría en la transferencia de grupos fosfatos a la Ser40 en eventos relacionados con despolarización (Dunkley y *col.*, 2004).

Por otro lado, TH es desfosforilada en los sitios anteriormente mencionados, principalmente por las proteínas fosfatasas 2A y 2C (PP2A y PP2C), las cuales serían las responsables de mantener los bajos niveles de fosforilación de esta enzima en condiciones basales (Dunkley y *col.*, 2004).

Las fosforilación de TH tiene como consecuencia un aumento en la síntesis de l-DOPA, sin embargo, ciertos experimentos indican que la fosforilación de TH en las Ser19 y

Ser31 no incrementarían directamente la función de esta enzima, sino que estas aumentarían la velocidad en la que la TH puede ser fosforilada en la Ser40, evento que sería responsable del incremento en la actividad de esta enzima (Gordon y *col.*, 2008). Por otro lado, la fosforilación de TH en la Ser31 por medio de CDK5, produce una estabilización de esta, aumentando su vida media, lo cual se traduce en una mayor síntesis de L-DOPA al favorecer una mayor concentración de esta enzima a lo largo del tiempo (Moy y Tsai, 2004).

Un mecanismo muy importante de regulación de la actividad enzimática de TH es a través de la retroalimentación negativa que sus propios productos de reacción, DA y NA, producen sobre ella. Esto funciona como un sistema de detección de las concentraciones de catecolaminas, fundamental para regular la síntesis de éstas, de acuerdo a las necesidades de la célula. La enzima TH, puede ser modulada por dos mecanismos de retroalimentación negativa por catecolaminas (Fujisawa y Okuno, 2005); en el primero la actividad de TH es inhibida por la habilidad de la DA y de la NA de competir con el BH₄ por unirse al sitio catalítico de la enzima, evitando la interacción de ésta con el cofactor. Este es un mecanismo cinético clásico, rápidamente reversible, que actúa como un sensor local de los niveles de catecolaminas. El segundo mecanismo consiste en la unión de DA directamente a la TH (Daubner y *col.*, 2011). Las catecolaminas pueden unirse a la TH en dos sitios diferentes, uno de baja afinidad y rápidamente reversible y uno de alta afinidad, casi irreversible el cual es el responsable de, que en condiciones de reposo, la mayoría de las moléculas de TH se encuentren en la forma inactiva (Gordon y *col.*, 2008). El sitio de baja afinidad de TH por DA, al igual que el mecanismo de competencia de ésta por BH₄, representarían mecanismos rápidos de regulación de la síntesis de DA, principalmente en función a las concentraciones locales de ésta y serían independientes de otros mecanismos de regulación mediados por señales intra o extracelulares. Estos mecanismos serían muy importantes luego de la liberación de DA, ya que cuando esto ocurre, el llenado de las vesículas sináptica produce una disminución de los niveles citosólicos locales de este neurotransmisor. Esto resulta en la disociación de las catecolaminas del sitio de baja afinidad (Gordon y *col.*, 2008) y el desplazamiento de la competencia entre estas y BH₄ en favor de esta última (Fujisawa y Okuno, 2005), provocando un aumento en la actividad de TH. Sin embargo, en condiciones de alta liberación de DA, la actividad de TH debe aumentar varias veces; bajo estas situaciones, los altos niveles de despolarización, junto con otras señales intracelulares,

producen la fosforilación de esta enzima. La fosforilación en la Ser40 produce la disociación de la DA del sitio de alta afinidad de TH, lo que permite que esta adopte una conformación activa, incrementando su actividad para proveer altos niveles de síntesis de DA (Gordon y col., 2008).

Liberación de dopamina.

El principal mecanismo de liberación de DA es a través de exocitosis, por medio de la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana plasmática. Esta fusión es dependiente de los aumentos de los niveles de Ca^{2+} , producto de la llegada de los diferentes potenciales post sinápticos excitatorios (PPSE). La principal fuente de Ca^{2+} proviene del espacio extracelular a través de canales de Ca^{2+} regulados por voltaje del tipo N o P/Q. La DA proveniente de los núcleos A8-A10 es liberada en Str, NAc y áreas corticales por medio de estructuras especializadas en los axones llamadas “varicosidades”, que son ensanchamientos en el diámetro del axón donde convergen múltiples dendritas provenientes de otras neuronas. Además de la liberación axonal clásica, la DA puede ser liberada desde el soma y/o las dendritas en la SNc y en el VTA representando un mecanismo de autoregulación de estas estructuras; incluso neuronas de la SNc envían dendritas hacia SNr que liberan DA (Rice y col., 2011). En un principio, se propuso que la liberación de DA somatodendrítica utilizaba un mecanismo diferente al axonal, sin embargo no existe evidencia fuerte que pueda contradecir el modelo original que sostiene que la DA somatodendrítica es liberada mediante exocitosis de vesículas. Gran cantidad de datos indican que ambos procesos serían similares ya que se ha demostrado que ambos comparten los mismos mecanismos y que son inhibidos si se bloquea la entrada de Ca^{2+} , Na^+ o se inhibe a VMAT-2, depletando las vesículas sinápticas de DA (Rice y col., 2011).

Las neuronas dopaminérgicas, tanto a nivel axonal como somatodendrítico, exhiben dos modos diferentes de liberación de DA, de acuerdo a dos patrones de disparo de sus potenciales de acción, los cuales pueden ser aislados o tónicos, o sostenidos en el tiempo y de alta frecuencia o fásicos (Goto y col., 2007).

El disparo tónico representa disparos de potenciales de acción espontáneos, espaciados en el tiempo y de neuronas individuales, impulsados por corrientes a través de la

membrana que funcionan de manera similar a las células marcapasos. Este tipo de actividad sináptica produce un “pool” de DA presente en el espacio extracelular, el cual cambia de una manera muy lenta (de segundos a minutos), debido a la frecuencia de los disparos y a que esta DA escapa hacia áreas extrasinápticas (Grace y Bunney, 1984b). Este nivel extracelular de DA (10-20 nM) es mantenido por el número de neuronas espontáneamente activas en la SNc o VTA (Floresco y col., 2001). El número de neuronas activas es regulado negativamente por aferencias gabaérgicas que llegan hacia estos núcleos (Floresco y col., 2001; Floresco, 2007).

El segundo modo de liberación de DA es mediado por un disparo explosivo y de alta frecuencia de las neuronas dopaminérgicas que producen una señal fásica, de acción rápida (en el orden de milisegundos) y que produce un gran aumento en los niveles de DA (de entre μM y mM), aunque espacialmente restringido (Grace y Bunney, 1984a). Diversas evidencias sugieren que la DA liberada de esta manera afectaría relativamente a pocas neuronas postsinápticas, debido a que la difusión hacia áreas extrasinápticas sería evitada por una rápida acción del DAT. Este mecanismo de disparo de las neuronas dopaminérgicas es mediado por aferencias excitatorias glutamatérgicas, provenientes de áreas corticales e hipocampo. Esta estimulación produce un incremento selectivo del disparo fásico de DA sin afectar el número de neuronas activas (Floresco y col., 2003; Floresco, 2007).

Remoción de la dopamina del espacio sináptico

Una vez liberada la DA en respuesta a la llegada de los potenciales de acción, ésta es retirada rápidamente del espacio sináptico nuevamente hacia el interior de la neurona a través del transportador de alta afinidad DAT, de esta forma, éste regula tanto la duración, como la intensidad de la transmisión sináptica. DAT se expresa selectivamente en la membrana plasmática de axones, dendritas y soma de las neuronas dopaminérgicas, encontrándose altamente enriquecido en la periferia de las sinapsis, pero ausente dentro de las áreas sinápticas activas (Nirenberg y col., 1996; Nirenberg y col., 1997).

DAT es parte de una familia de transportadores Na^+/Cl^- de la que también forman parte NAT, SERT y un transportador de GABA, con los cuales comparte homología y mecanismos de regulación (Torres, 2006). Dada su importancia, la función de DAT es

altamente regulada por una amplia gama de moléculas, que incluyen a PKA, PKC, CAMK-2, tirosinas quinasas (TK) y α -sinucleína, entre otros. DAT presenta múltiples sitios de fosforilación y es fosforilado *in vivo* por numerosas quinasas como PKC o TK, sin embargo no se conoce la función fisiológica de estas fosforilaciones ya que aparentemente no producen alteraciones en su función (Chang y *col.*, 2001; Torres, 2006).

El principal mecanismo de regulación de la función de DAT es llevado a cabo mediante la modulación de sus niveles en la membrana plasmática, por medio de la remoción de éste por endocitosis (Melikian y Buckley, 1999). Esta endocitosis, la cual es realizada en vesículas cubiertas de clatrina, puede responder tanto a un mecanismo constitutivo de reciclaje o puede ser regulada por diversas proteínas y señales intra o extracelulares (Melikian, 2004; Sorkina y *col.*, 2005). El mecanismo más estudiado y aparentemente más importante en la regulación de la función de DAT es la endocitosis de éste por medio de la activación de PKC en respuesta a estímulos como despolarización o aumentos en los niveles de Ca^{2+} (Loder y Melikian, 2003). Por otro lado, la insulina o el factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF) producen aumentos en los niveles de inserción de DAT en la membrana plasmática a través de receptores TK, los cuales activan vías de señalización que incluyen a la quinasa de fosfoinositol 3 (PI3K) y MAPKs (Hoover y *col.*, 2007). Los niveles de inserción de DAT en la membrana plasmática son también regulados por los niveles de DA en la sinapsis. Estudios mediante microscopía de reflexión total de fluorescencia interna (TIRFM) realizados en líneas neuronales y de biotilación de proteínas de superficie celular de sinaptosomas de Str, demostraron que la administración de dosis fisiológicas de DA producen un aumento rápido, detectable a los dos minutos post administración, de los niveles de DAT en la membrana plasmática. Además, encontraron que los niveles de éstos comienzan a disminuir hasta niveles basales luego del lavado de la DA (Furman y *col.*, 2009). Por otro lado, otro trabajo, indicó que dosis mayores de DA producen una disminución de los niveles de DAT en la superficie celular y que éste permanecía disminuido durante al menos 50 minutos (Chi y Reith, 2003; Richards y Zahniser, 2009). Estos resultados podrían ser explicados si se tiene en cuenta que inmediatamente después de la liberación de DA, sería necesaria una mayor capacidad de recaptación de DA por lo que se favorecería la inserción de DAT en la membrana (Furman y *col.*, 2009). Por otro lado, la disminución de DAT luego de periodos prolongados de altas concentraciones de DA podría

representar un mecanismo de protección, dado que la DA citosólica puede ser tóxica para las neuronas (Ziv y *col.*, 1994). Además, ha sido demostrado que moléculas que actúan como sustrato para DAT, especialmente ANF, producen efectos en el tráfico de DAT desde y hacia la membrana en una manera muy similar a lo observado con DA, es decir un aumento transitorio a bajas dosis, y una disminución crónica a mayores dosis y tiempos de administración (Kahlig y Galli, 2003; Furman y *col.*, 2009; Richards y Zahniser, 2009) . Contrariamente, fármacos que bloquean a DAT, como COC y MTF, producen aumentos en los niveles de expresión de este transportador y un aumento en los niveles de recaptación de DA luego de la eliminación de estos (Little y *col.*, 2002; Kahlig y Galli, 2003) .

Degradación enzimática y metabolismo de la dopamina

Una vez liberada, la DA puede ser degradada principalmente por dos mecanismos diferentes de acuerdo a su ubicación (Figura 10). En primer lugar, la DA extracelular que escapa al transporte por DAT es metilada por la enzima catecol-O-metiltransferasa (COMT) a 3-metoxitiramina, el cual luego es convertido en ácido homovanílico (HVA) por la enzima

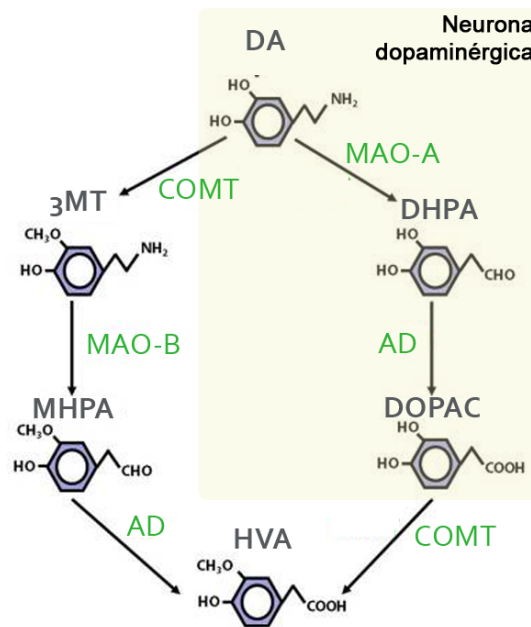


Figura 10: Metabolismo degradativo de la dopamina. DA: dopamina. MAO: monoamino oxidasa. COMT: Catecol-O-metiltransferasa. 3MT: 3-metoxitiramina. DHPA: dihidroxifenil acetaldehído. AD: aldehído deshidrogenasa. MHPA: metoxihixroxifenil acetaldehído. DOPAC: ácido dihidroxifenil acético. HVA: ácido homovanílico. Modificado de (Laatikainen y *col.*, 2013)

monoamino oxidasa (MAO) en el interior de las células gliales (Qi y col., 2008; Best y col., 2009). La enzima MAO comprende dos isoformas diferentes MAO A y B; de las cuales, en roedores, la isoforma A se expresa principalmente en células dopaminérgicas y noradrenérgicas, mientras que MAO-B se ubica preferencialmente en la glia (Gesi y col., 2001).

Por otro lado, el exceso de DA intracelular que no puede ser reciclada dentro de vesículas sinápticas es oxidada a ácido dihidroxifenil-acético (DOPAC) por medio de la acción secuencial de MAO y la enzima aldehído deshidrogenasa; posteriormente DOPAC, es transportado fuera de la neurona dopaminérgica y puede ser luego convertido en HVA por medio de COMT (Gesi y col., 2001) (Figura 10). El HVA representa el producto final de la vía de degradación de la DA, siendo en primates el principal metabolito del catabolismo de esta, sin embargo, en roedores el metabolito mas abundante es DOPAC. La diferencia en la abundancia de estos se debe a que en roedores DOPAC es producido principalmente en una forma que contiene un grupo sulfonato el cual evita que ésta sea luego degradada por COMT, mientras que en primates DOPAC se encuentra en una forma no sulfonada la cual si puede ser convertida en HVA (Elsworth y Roth, 1997).

Receptores dopaminérgicos.

Receptores acoplados a proteína G.

Los receptores de DA son miembros de una superfamilia de receptores de membrana acoplados a una proteína que puede unir nucleótidos de guanina, llamada proteína G. Estos receptores comprenden una familia de receptores altamente conservada en la evolución, y esta formada por receptores que se unen a más de 200 ligandos conocidos y más de 160 receptores huérfanos, de los cuales el 90% se encuentra expresado en el

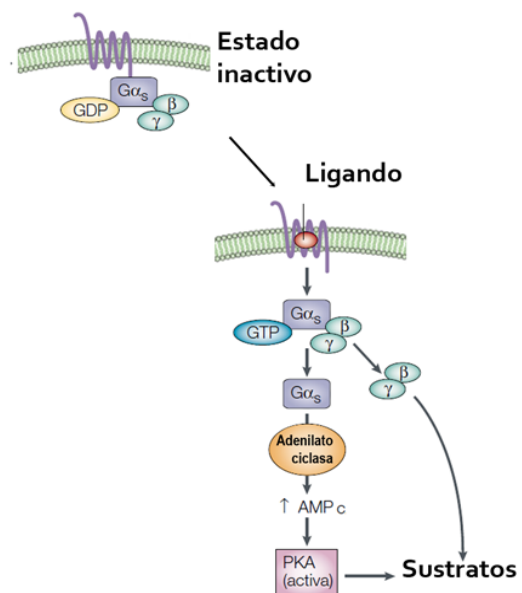


Figura 11: Mecanismo de señalización a través de proteína G. Modificado de Pierce y col., 2002.

sistema nervioso. Estos receptores están formados por una proteína con 7 dominios transmembrana, con su extremo N-terminal en el espacio extracelular, responsable del reconocimiento del ligando y el extremo C-terminal hacia el interior de la célula (Pierce y col., 2002). La principal diferencia entre los distintos tipos de estos receptores reside en el tercer bucle intracelular, el cual es el responsable de la interacción del receptor con un tipo específico de proteína G. Cada receptor específico puede acoplarse y activar solo un tipo de proteína G, cada una relacionada con diferentes mecanismos de señalización intracelular (Luquin-Piudo y Sanz, 2011). Cada proteína G es un heterotrímero formado por tres subunidades, denominadas, α , β , y γ . La subunidad α contiene el sitio de unión a guanina, mientras que las dos restantes se encuentran fuertemente unidas formando un complejo. Cuando el receptor se encuentra inactivo, la subunidad α está unida a guanina difosfato (GDP) y al complejo $\beta\gamma$, formando la proteína trimérica. Cuando el receptor es estimulado por la unión del ligando, el GDP se libera de la subunidad α y es reemplazado por una guanina trifosfato (GTP). Esta unión a GTP activa a la subunidad α la cual se disocia del complejo $\beta\gamma$, pudiendo ambos complejos activar diferentes vías de transducción de señales. Una vez disociado el ligando del receptor, el GTP es hidrolizado a GDP y la subunidad α se reasocia con $\beta\gamma$ finalizando la señalización y volviendo al estado inactivo (Gainetdinov y col., 2004) (Figura 11). Si bien ambos complejos tienen capacidad para activar segundos mensajeros, por lo general la señalización más importante es llevada a cabo por medio de la subunidad α , por lo que las proteínas G suelen clasificarse de acuerdo al tipo de subunidad α a la que se encuentran asociadas (Gainetdinov y col., 2004; Beaulieu y Gainetdinov, 2011).

Tipos de receptores dopaminérgicos.

En función del tipo de proteína G a la que se acoplan, a su secuencia y a sus características farmacológicas, existen al menos 5 tipos de receptores dopaminérgicos, los cuales se clasifican en dos subtipos (Tabla 6). El tipo D1, incluye a los receptores D1 y D5, los cuales se encuentran acoplados a una proteína $G_{\alpha s}$ y el tipo D2 las cuales se acoplan con proteínas $G_{\alpha i}$. La principal diferencia entre las proteínas $G_{\alpha s}$ y $G_{\alpha i}$ (y entre los receptores tipo D1 y D2) radica en la capacidad de las primeras en activar la enzima adenilato ciclasa, la cual cataliza la conversión de adenosina trifosfato (ATP) a AMPc, mientras que las proteínas $G_{\alpha i}$ inhiben a adenilato ciclasa y consecuentemente reducen los niveles de AMPc (Missale y col., 1998; Beaulieu y Gainetdinov, 2011). La principal consecuencia del aumento de los

Tabla 6: Propiedades de los receptores dopaminérgicos^{a,b}

Receptor	Tipo D1			Tipo D2	
	D1	D5	D2	D3	D4
Nombre del gen	Drd1a	Drd5	Drd2	Drd3	Drd4
Número de intrones	0	0	6	5	3
Variables por splicing alternativo	No	No	Si, D2l y D2s	Si	Si
% homología con D1	100	82	44	44	42
% homología con D2s	44	49	100	76	54
Afinidad por DA (µM)	1,0-5,0	0,2-2,0	0,2-2,0	0,02-0,2	0,01-0,1
Proteína G acoplada	Gα _s , Gα _{off}	Gα _s , Gα _q	Gα _i , Gα _o	Gα _i , Gα _o	Gα _i , Gα _o
Agonistas típicos	SKF81297, SKF38393		QNP, quinolorane	QNP	CP266269
Antagonistas típicos	SCH23390		HAL, Sulpiride, Raclopride		Clozapina
Localización sináptica	Postsináptica	Postsináptica	Post y presináptica	Post y presináptica,	Postsináptica
Localización anatómica	Str, NAc, T. olfatorio, hipotalamo, talamo, corteza frontal, amígdala, hipocampo	Hipocampo, talamo, nucleo mamilar, Str, corteza.	Str, NAc, T.olfatorio, corteza cerebral.	NAc, T. olfatorio, islas de Calleja, corteza.	Corteza frontal, cerebro medio, hipocampo, hipotalamo, medula, retina.

Modificado de ^aTritsch y Sabatini, 2012 ^b Marsden, 2006..

DA: dopamina, Str: estriado, NAc: nucleus accumbens. HAL: haloperidol. QNP:Quinpirole,

niveles de AMPc es la activación de la PKA, la cual mediante fosforilación puede regular la síntesis de proteínas citoplasmáticas y nucleares, la función de canales iónicos, el metabolismo celular y la sensibilización de diferentes receptores acoplados a proteína G (Vallone y *col.*, 2000).

Los receptores de DA pueden regular los niveles de Ca²⁺, mediante la actividad de los canales de Ca²⁺ y de la movilización de este ión desde compartimientos intracelulares a través de mecanismos dependientes e independientes de PKA. La regulación de los niveles de Ca²⁺ es muy importante debido no solo a su papel en la liberación de vesículas sinápticas y modulación de la excitabilidad neuronal, sino también a que éste participa como segundo mensajero en mecanismos de transducción de señales, como los llevados a cabo por Ca²⁺/calmodulina y CaMPK-2.

A su vez los receptores de DA pueden activar a la enzima fosfolipasa C (PLC), la cual convierte el fosfatidil-inositol bifosfato (PIP2) en inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). El IP3 produce la movilización de Ca²⁺ desde compartimientos intracelulares hacia el

citoplasma mientras que DAG produce la activación de PKC (Vallone y *col.*, 2000; Pivonello y *col.*, 2007) (Figura 12).

Receptor D1

D1 es el receptor de DA mas abundante en todo el sistema nervioso central, encontrándose altamente concentrado en CpF, Str, NAc y bulbo olfatorio y en menor medida en hipocampo y amígdala. A nivel celular se encuentra distribuido tanto en terminales axonales y dendríticas, con sus mayores niveles en espinas dendriticas (Pivonello y *col.*, 2007). D1, por medio de la proteína $G\alpha_s$ regula la activación de adenilato ciclasa. Además, por medio de la proteína $G\alpha_q$ puede aumentar la hidrólisis de PIP2 (Beaulieu y Gainetdinov, 2011). Por otro lado la estimulación de D1 incrementa las corrientes de Ca^{2+} por medio de canales tipo L y reduce la mediadas por canales tipo N y P; además, puede movilizar Ca^{2+} de compartimientos intracelulares (Surmeier y *col.*, 2011). La activación de D1 inhibiría las corrientes de salida de K^+ , lo cual combinado con los aumentos en las corrientes de Ca^{2+} favorecería la excitabilidad de la neurona (Surmeier y *col.*, 2011).

Receptor D5.

El receptor D5 tiene una ubicación mas dispersa y sus niveles de expresión son menores que los de D1. Este se encuentra en amígdala, corteza frontal, hipocampo, Str,

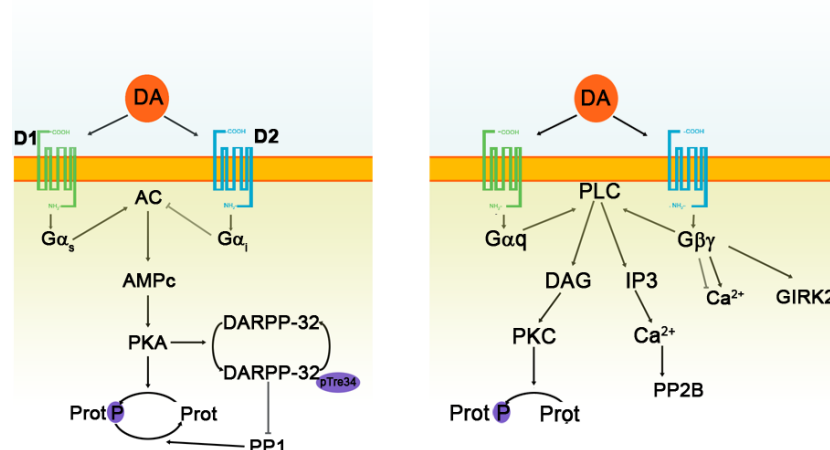


Figura 12: Vías de señalización de los receptores D1 y D2. AC: adenilato ciclasa. AMPc: adenosina monofosfato cíclica. PKA, proteína quinasa A. DARPP-32: Fosfoproteína regulada por dopamina y AMPc, de peso molecular 32kDa. PP1: proteína fosfatasa 1. PP2B: proteína fosfatasa 2B. P: grupos fosfato. Modificado de Tritsch y Sabatini, 2012.

ganglios basales, hipotálamo, tálamo y cerebelo, y presenta una afinidad por DA 10 veces mayor que D1. Este se ubica en áreas perinucleares y en dendritas proximales, y es el único receptor de DA presente en interneuronas colinérgicas de Str de primates (Wu y col., 2012). Además de su actividad positiva sobre adenilato ciclasa, se ha citado que D5 puede regular la función de neuronas gabaérgicas mediante una interacción directa con el receptor GABA_A (Liu y col., 2000).

Receptor D2

D2 puede presentar dos isoformas, una denominada larga (long) D2l y una corta (short) D2s, producidas por un “splicing” alternativo del ARNm a partir de un único gen. Los receptores D2 presentan una amplia distribución a lo largo del cerebro, con su mayor concentración en Str, tubérculo olfatorio, SN, VTA y Nac (Wu y col., 2012). D2 se expresa tanto en neuronas pre como postsinápticas (Naughton y col., 2012), siendo D2l principalmente postsináptico y D2s presináptico. A nivel subcelular D2 puede ubicarse en axones, dendritas y espinas dendríticas. D2 inhibe la actividad de adenilato ciclasa por medio de proteína G α i/o y activa a PLC por medio del complejo $\beta\gamma$. La regulación de Ca²⁺ por medio de D2 es sumamente compleja, ya que la estimulación de éste inhibe las corrientes de Ca²⁺ a través de canales de Ca²⁺ tipo L, mientras que el complejo $\beta\gamma$, activa la síntesis de ácido araquidónico, el cual produce liberación de Ca²⁺ desde reservorios intracelulares hacia el citosol (Bonci y Hopf, 2005). La regulación de los aumentos de Ca²⁺ en las neuronas presinápticas es muy importante ya que Ca²⁺/calmodulina, a través de CAMPK-2, es uno de los principales mecanismos de activación de TH (Dunkley y col., 2004). Además el complejo $\beta\gamma$ en neuronas presinápticas activa al canal de K⁺, GIRK2, lo que hiperpolariza a la membrana y disminuye la probabilidad de disparo de las neuronas dopaminérgicas (Grace, 2000; Beaulieu y Gainetdinov, 2011).

Receptor D3

El receptor D3 presenta su mayores niveles de expresión en áreas ML, especialmente en Nac_{shell}; se expresa también en niveles considerables en SNc y en Str, y en menor medida en *Isla de Calleja* y bulbo olfatorio (Liu y col., 2000). Puede ubicarse tanto en neuronas que reciben inervación dopaminérgica, como en neuronas presinápticas donde podría regular la síntesis y liberación de DA, sin embargo, su papel como autoreceptor no ha sido del todo confirmado (Shafer y Levant, 1998). El receptor D3 realiza sus funciones a

través de proteína G α i/o. La mayor función biológica de D β 3 es modular la hidrólisis de PIP β 2, regulando la función de canales de K β y de canales de Ca β 2+ tipo P/Q y estimulando la actividad de MAPK (Kuzhikandathil y Oxford, 1999). Además, puede inducir la fosforilación de diversos sustratos por medio de PKC por un mecanismo independiente de proteína G (Cussac y *col.*, 1999).

Receptor D4

El receptor D4 puede encontrarse especialmente en todas las regiones del hipocampo, corteza frontal y corteza entorinal, Str, tuberculo olfatorio y cerebelo. En el NAC, D4 se encuentra solo en interneuronas colinérgicas. Este se ubica en la periferia del cuerpo neuronal y también se ha encontrado en dendritas estriatales que se extienden hacia la SN (Rivera y *col.*, 2002; Wu y *col.*, 2012). En estas áreas su principal rol es mediar en la neurotransmisión corticoestriatal a través de la regulación directa de los receptores ionotrópicos de GLU, mediante la metilación de fosfolípidos y afectando la cinética de canales iónicos (Kuznetsova y Deth, 2008). Si bien se encuentra acoplado a proteína G α i, su rol en la regulación de los niveles de AMPc en neuronas es menos claro (Missale y *col.*, 1998; Beaulieu y Gainetdinov, 2011).

Colocalización entre receptores D1 y D2

Sumado a la gran complejidad de los mecanismos de señalización intracelulares resultantes de la activación de los receptores de DA, cabe destacar que en algunas áreas cerebrales existen poblaciones de neuronas que expresan más de un tipo de receptores dopaminérgicos lo que dificulta comprender el funcionamiento de estos. Esto es fundamentalmente importante en Str, donde el 25% de las NSM coexpresan receptores D1 y D2, en las cuales algunas funciones de éstos son totalmente antagónicas, como la regulación de la vía AMPc/PKA, mientras que otros mecanismos podrían funcionar de manera sincrónica como la señalización a través de IP β 3 y DAG (Beaulieu y Gainetdinov, 2011). La coexpresión de receptores D1 y D2 puede encontrarse también en ganglios basales y en neuronas piramidales ubicadas en corteza, en donde además se ha encontrado que estos receptores pueden encontrarse unidos formando heterodímeros que funcionan como unidades de señalización (Beaulieu y Gainetdinov, 2011).

Si bien, como se menciona anteriormente, la señalización intracelular por DA es muy compleja, todos sus receptores tienen un componente en común, la modulación de PKA

a través de los niveles de AMPc. A pesar de que la regulación de PKA es muy compleja, en neuronas dopaminérgicas la señalización por medio de AMPc/PKA es modulada por la acción de CDK5, siendo esta última quinasa un regulador muy importante en el funcionamiento de estas neuronas (Greengard, 2001a). Además, CDK5 no solo modula la función de estas células mediante su efecto sobre PKA sino también mediante la fosforilación directa de diversos sustratos y mediante la modulación de quinasas y fosfatasa (Bibb y *col.*, 1999; Greengard, 2001b).

LA QUINASA DEPENDIENTE DE CICLINA 5.

Generalidades.

CDK5 es una proteína muy importante para el funcionamiento del sistema nervioso central debido a la gran cantidad de funciones y procesos en los que participa. CDK5 forma parte de la familia de quinasas dependientes de ciclinas (CDK) debido a la homología de su secuencia con la de otros miembros de esta familia (Hellmich y *col.*, 1992), sin embargo CDK5 no es regulada por ciclinas ni participa en la modulación del ciclo celular (Tsai y *col.*, 1993).

Activación.

De manera similar a otras CDKs, CDK5 en estado monomérico no presenta actividad catalítica y requiere de la unión de un cofactor regulador para su activación. Existen dos activadores específicos de CDK5, p35 y p39, siendo la unión de alguno de estos con CDK5 suficiente para que esta quinasa sea completamente activa. Por otro lado, se ha demostrado que, tanto p35 y p39 pueden ser objeto de un clivaje proteolítico que produce dos fragmentos, p25 y p29 respectivamente, los cuales también tienen capacidad de activar a CDK5, aunque la localización subcelular, la cinética de la activación y otras propiedades de esta se ven afectadas. Los cambios en la localización subcelular o enriquecimiento de CDK5 en dominios celulares particulares pueden deberse a que p35 y p39 contienen sitios de miristilación a través de los cuales pueden asociarse a la membrana celular, por lo que CDK5 unido a p35 o p39 puede encontrarse formando un complejo asociado a membrana; sin embargo el clivaje a p25 o p29 produce una escisión cerca del sitio de unión a membrana por lo que el complejo puede liberarse al citosol (Patrick y *col.*, 1999), este cambio en la localización subcelular podría producir una modificación en los sustratos afectados por CDK5 (Mlewski y *col.*, 2008).

Si bien la unión de CDK5 con p25 no produce una holoenzima con mayor actividad que el formado por CDK5/p35, ésta produce una activación mas prolongada en el tiempo, debido a que la vida media de p25 es mayor que la de p35. Una sobreactivación de CDK5 sostenida en el tiempo se ha relacionado, en varias ocasiones, con enfermedades

neurodegenerativas, principalmente Alzheimer y esclerosis lateral amiotrófica (ALS) (Cruz y col., 2003; Cheung y Ip, 2012).

El activador p35 es una proteína con una vida media corta, de aproximadamente 25 a 35 minutos, debido a que puede ser objeto de al menos dos mecanismos de degradación. En el primero, p35 es clivada en varios puntos y degradada por la vía proteosomal, mientras que en la segunda, esta es escindida en un sitio específico por una proteasa de cisteínas dependiente de Ca^{2+} (calpaína) lo que produce el fragmento p25 (Lee y col., 2000; Hisanaga y Saito, 2003). La producción de p25 estaría regulada por aumento de los niveles de Ca^{2+} intracelular, los que activarían a calpaína y además producirían una activación alternativa de CDK5, la cual fosforila a p35 haciéndola más susceptible de ser clivada (Kerokoski y col., 2002).

En un principio, se pensaba que CDK5 solo estaba relacionada con el sistema nervioso central, pero luego se encontró que esta cumple importantes funciones en otros sistemas, especialmente durante el desarrollo y diferenciación, tales como en miocitos, monocitos durante la hematopoyesis, células de Sertoli, células de Leydig, en tejido espermático y en retina, entre otros (Dhavan y Tsai, 2001). Sin embargo, los mayores niveles de expresión de p35 y p39 se encuentran en el sistema nervioso central, especialmente en células post mitóticas.

El patrón de expresión de p35 y p39 difiere en las etapas del desarrollo, donde p39 parece tener su papel más importante en etapas embrionológicas tempranas, mientras que en el animal adulto prácticamente toda la función es atribuible a p35 (Ko y col., 2001). Animales genéticamente modificados que no expresan CDK5 (CDK5-KO) suelen ser inviables o presentar mortalidad perinatal al igual que animales doble KO para p35 y p39. Los animales que carecen del activador p35 presentan algunas anormalidades anatómicas, funcionales y comportamentales, pero son perfectamente viables, indicando que p39 puede activar a CDK5 en etapas embrionarias y rescatar algunos aspectos de la falta de p35 (Chae y col., 1997). Por otro lado, los ratones p39KO son prácticamente indistinguibles de los animales tipo salvaje (wild type, WT), señalando que p35 puede suplir toda la falta de función de p39 (Ko y col., 2001). Estos datos indican que p35 es el activador más importante de CDK5 tanto en el animal adulto como en etapas tempranas del desarrollo, sin embargo p39 ha sido mucho menos estudiado, por lo que su función e importancia es menos conocida.

Funciones de CDK5

CDK5 ejerce su función fosforilando una gran serie de sustratos, en este sentido es un quinasa prolina-dirigida que añade grupos fosfatos en Ser y treoninas (Tre) precedidas por prolinas. CDK5 participa en una gran cantidad de procesos celulares necesarios para el normal desarrollo y funcionamiento de las neuronas (Figura 13). CDK5 es crucial durante la diferenciación neuronal, donde participa en procesos de formación axonal, de neuritas, trafico de membranas; además, participa en migración neuronal, regulación de la dinámica del citoesqueleto y en procesos superiores como aprendizaje, memoria y adicción a drogas (Nikolic y *col.*, 1996; Paglini y *col.*, 1998; Paglini y Caceres, 2001; Paglini y *col.*, 2001; Benavides y Bibb, 2004; Cheung y *col.*, 2006).

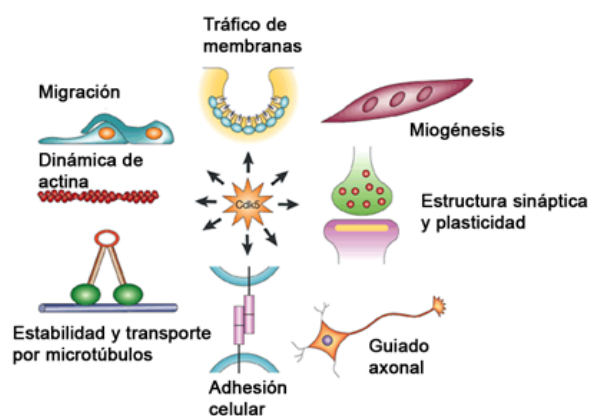


Figura 13: Funciones celulares de CDK5. Modificado de Dhavan y Tsai, 2001.

Adhesión y migración celular.

CDK5 participa en procesos de migración neuronal durante la formación del cerebro, donde se ha observado que la carencia de ésta produce un patrón de laminación anormal en la corteza cerebral y de agregación de neuronas en las capas inferiores de esta (Chae y *col.*, 1997). La migración neuronal es un mecanismo complejo para el cual se necesita una perfecta coordinación entre procesos de adhesión celular, de trafico de membranas y de la dinámica del citoesqueleto durante la movilidad celular. CDK5 participa en todos estos procesos.

Los mecanismos de adhesión focal celular pueden ser de dos tipos, entre las células y la matriz extracelular o entre células con otras células. Las adhesiones con la matriz extracelular proporcionan los puntos de apoyo requeridos para el crecimiento celular y para la tracción durante la migración celular. Las adhesiones focales célula-célula son críticas para el reconocimiento entre ellas, para la agregación y exclusión de células diferentes, fenómenos importantes en la organización de la citoarquitectura de los tejidos. Estos dos tipos de adhesiones pueden ser transitorias o estables y las células regulan su conversión entre estos estados para mantenerse fijas, migrar, aumentar su cohesión o separarse. CDK5 juega un rol crítico en esta dinámica (Lalioi y *col.*, 2010).

CDK5 participa en la adhesión entre células y la matriz extracelular fosforilando y regulando tres proteínas, talina (Tln), kindlina (Knd) y paxilina (Pxn) (Lalioi y *col.*, 2010). Tln y Knd participan en la unión entre el citoesqueleto de actina y β -integrinas las cuales se unen con diversos componentes de la matriz extracelular (Moser y *col.*, 2009). Pxn, en cambio, participa en la transducción de señales entre la matriz extracelular y la célula. Además Pxn participa en la activación de una familia de proteínas denominadas RhoGTPasas, cruciales en la dinámica del citoesqueleto de actina y de las adhesiones focales. CDK5 regula a Pxn modulando su fosforilación directamente y a través de otras quinasas (Miyamoto y *col.*, 2007).

El reconocimiento entre células se produce mediante la interacción entre proteínas expresadas en la membrana celular llamadas cadherinas (Cdh), las cuales se unen al citoesqueleto de actina mediante otras proteínas ubicadas en el lado intracelular denominadas cateninas (Ctn) (Halbleib y Nelson, 2006). Además, una forma de Ctn, β -Ctn, forma un complejo con dineína (Din), proteína mediante la cual se une a microtúbulos, estabilizando la unión al citoesqueleto y aumentando la cohesión con las células adyacentes (Ligon y *col.*, 2001). Se ha demostrado que CDK5 puede unirse a Din por medio de p35 y que la sobreexpresión de CDK5/p35 produce la desestabilización entre Cdh/Ctn, lo que produce una disminución en la cohesión celular. Por otro lado la inhibición de CDK5 aumenta la cohesión y produce agregación celular; esto podría explicar los agregados neuronales encontrados en capas inferiores de la corteza en ratones p35KO (Kwon y *col.*, 2000).

Durante la migración neuronal, CDK5 es crucial para la integración de señales quimiotácticas que guían a las células hacia su posición final. Uno de los mecanismos mas

importante de señales para este proceso son los mediados por relina (Rln) y semaforina 3A (Sem3A), que incluye múltiples vías de señalización, en las cuales CDK5 juega un papel importante (Lalioi y *col.*, 2010); en este sentido, ha sido demostrados que la disrupción de la vía Rln/Sem3A estaría relacionada con la incorrecta laminación de la corteza encontrada en ratones que no expresan p35 (Ohshima y *col.*, 2007).

CDK5 en la dinámica del citoesqueleto

La dinámica del citoesqueleto es un mecanismo crucial en el funcionamiento de las neuronas tanto durante el desarrollo, migración y diferenciación, como en neuronas adultas, donde éste participa en procesos fisiológicos como transporte y señalización intracelular, plasticidad sináptica y formación y remodelación de espinas dendríticas. Dada la gran cantidad de eventos en que el citoesqueleto participa, la regulación de su dinámica es un proceso altamente complejo. CDK5 participa en la modulación la dinámica del citoesqueleto, regulando múltiples proteínas que forman parte de los tres componentes del citoesqueleto, es decir, microtúbulos, microfilamentos de actina y filamentos intermedios (Smith, 2003).

Como se señaló anteriormente, CDK5 participa en la dinámica del citoesqueleto de actina, principalmente a través de la regulación de RhoGTPasas, que incluyen a Rac, Rho y Cdc42 (Lalioi y *col.*, 2010). CDK5 sería especialmente importante durante la desestabilización del citoesqueleto de actina promoviendo procesos dinámicos, como la extensión celular y la formación y remodelación de espinas dendríticas. Uno de los mecanismos mas importantes de regulación de la dinámica de actina por CDK5 es mediante la inhibición de la quinasa activada por p21 1 (PAK1) directamente y por medio de Rac; PAK1 puede fosforilar directamente a filamentos de actina (Rashid y *col.*, 2001). Por otro lado, CDK5 puede fosforilar e inhibir a la proteína wave, la cual participa en la ramificación de los microfilamentos de actina y es importante para la regulación de la morfología de espinas dendríticas (Kim y *col.*, 2006).

Diversas proteínas que participan en la regulación de la dinámica del citoesqueleto son sustratos de CDK5, incluyendo proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) como MAP1B y Tau (una MAP específica de neuronas). La fosforilación de MAP1B por CDK5 ha sido implicada en la extensión de neuritas (Pigino y *col.*, 1997). Por otro lado CDK5, fosforilaría a Tau solo en condiciones patológicas, especialmente en enfermedad de Alzheimer y ALS,

donde la hiperfosforilación de Tau promovería el desensamblaje de los extremos de los microtubulos (Ahlijanian y *col.*, 2000).

CDK5 también puede regular la estabilidad y elongación de microtúbulos a través de p35. Se ha demostrado que p35 puede unirse directamente a α y β -tubulina favoreciendo la formación de dendritas. Este proceso es inhibido por la propia CDK5 la cual puede fosforilar a p35 y promover su degradación (He y *col.*, 2008). A su vez, CDK5 también regula la estabilidad de los microtúbulos ya ensamblados manteniendo la acetilación de α -tubulina (Pandithage y *col.*, 2008).

Por otra parte, CDK5 regula la función de los filamentos intermedios. Una de las principales funciones de los filamentos intermedios es regular el diámetro de los axones, pero además, participan en la modulación de otros componentes del citoesqueleto. Se ha demostrado que la fosforilación de los filamentos intermedios por CDK5 reduce su interacción con microtúbulos lo que modifica su función durante la dinámica del citoesqueleto (Pandithage y *col.*, 2008).

CDK5 en exocitosis y endocitosis de vesículas sinápticas.

Los mecanismos de endocitosis y exocitosis son procesos universales que se producen en casi todo los tipos celulares, sin embargo, en neuronas estos suelen tener funciones específicas relacionadas con la transmisión sináptica. Durante este proceso, la liberación de los neurotransmisores es regulada a través de un complejo control del ciclo de las vesículas sinápticas, en el cual, el aumento de los niveles de Ca^{2+} inducen la exocitosis del neurotransmisor, lo que es seguido por el reciclaje de la vesícula a través de endocitosis mediada por clatrina y finalmente por la remoción de la cubierta de clatrina de ésta, quedando la vesícula lista para ser cargada nuevamente con el neurotransmisor; múltiples evidencias indican que CDK5 participa en todos estos eventos (Cheung y *col.*, 2006).

CDK5 puede regular la liberación de neurotransmisores mediante al menos tres mecanismos. En el primero, CDK5 favorece la liberación sináptica al facilitar la interacción entre proteínas SNARE, presentes en la vesícula sináptica (vSNARE) y la membrana plasmática (tSNARE), especialmente syntaxina-1A. La interacción entre las proteínas vSnare y tSnare es necesaria para la fusión de vesículas con la membrana sináptica y la posterior exocitosis. Durante condiciones de reposo, syntaxina-1A se encuentra unida a Munc-18, lo que evita su unión con las vSnare, sin embargo, CDK5 fosforila a Munc-18 produciendo que

esta se disocia de Sintaxina-1A, permitiendo la formación del complejo Sintaxina-1A/vSNARE y la consecuente fusión sináptica (Cheng y Ip, 2003).

Otro mecanismo descrito propone que CDK5 puede interferir durante la exocitosis por medio de la proteína Pictaire, inhibiendo la formación del complejo vSNARE/tSNARE (Liu y *col.*, 2006). Por otro lado, ha sido demostrado que CDK5 puede modular negativamente la liberación de neurotransmisores, al disminuir la función de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo P/Q, reduciendo la entrada de Ca^{2+} e inhibiendo la interacción de este canal con otras proteínas del tipo SNARE (SNAP-25 y sinaptotagmina), necesaria para la fusión de las vesículas sinápticas (Tomizawa y *col.*, 2002; Cheng y Ip, 2003).

En adición a la regulación de la exocitosis, se ha demostrado que CDK5 fosforila a las proteínas dinamina y anafisina-1, esenciales para la endocitosis mediada por clatrina (Tomizawa y *col.*, 2002; Tan y *col.*, 2003). Además, CDK5 participa en el reclutamiento de vesículas sinápticas desde la membrana, a través de la vía del PIP2, en el cual participa la proteína de adhesión focal Fln (Lee y *col.*, 2005). Finalmente, también se ha demostrado que la actividad de CDK5 inhibe la función de la proteína sinaptojanina, necesaria para la remoción de la cubierta de clatrina de las vesículas recientemente endocitadas, paso previo para que éstas puedan entrar nuevamente en el ciclo de las vesículas sinápticas (Lee y *col.*, 2005).

Conjuntamente, a excepción de su acción sobre Munc-18, CDK5 sería un regulador negativo de la liberación de neurotransmisores (Cheung y *col.*, 2006). Esta premisa es también apoyada por el hecho de que la actividad de CDK5 provoca una disminución en los niveles de liberación de DA en el Str (Chergui y *col.*, 2004).

Regulación de la función sináptica.

CDK5 participa también en la integración de señales en las neuronas postsinápticas. CDK5 tiene un importante papel en la modulación de las señales glutamatérgicas. Se ha demostrado que CDK5 puede alterar la función del receptor N-metil-D-Aspartato (NMDA) de GLU, modulando la conducción de iones a través de éste. En el hipocampo, CDK5 puede fosforilar a la subunidad NR2A del receptor NMDA aumentando las corrientes iónicas a través de este, estimulando su función (Li y *col.*, 2001). Sin embargo, en neuronas del Str, CDK5 inhibiría al receptor NMDA regulando indirectamente a la subunidad NR1 (Chergui y

col., 2004), señalando que los efectos de CDK5 sobre la transmisión sináptica glutamatérgica son complejos y difieren de acuerdo al tipo celular y al área cerebral.

Por otro lado, la acción de CDK5 reduciría la agregación de receptores NMDA y de diversos canales iónicos en estructuras denominadas “clusters” en zonas de las sinapsis llamadas densidad postsináptica, a través de la regulación de la proteína PSD-95. La formación de estas estructuras es crucial en plasticidad sináptica (Morabito y col., 2004). Además, se ha citado que CDK5 participa en la regulación transcripcional de receptores colinérgicos y de GABA (Cheung y col., 2006).

CDK5 en la integración de la señalización dopaminérgica.

Como se comentó anteriormente, CDK5 es un importante regulador de la función dopaminérgica en neuronas presinápticas, donde participa en la liberación y síntesis de DA (Chergui y col., 2004; Moy y Tsai, 2004), pero además esta quinasa juega un rol fundamental

en la señalización a través de DA y sus receptores en neuronas postsinápticas (Figura 14).

La señalización dopaminérgica converge con CDK5 en la *fosfoproteína regulada por DA y AMPc de peso molecular 32 kDa* (DARPP-32) (Bibb y col., 1999), una proteína clave que puede funcionar como inhibidor de quinasas o fosfatasa dependiendo de su propio estado de fosforilación, lo que le permite actuar como un “switch” o interruptor molecular (Greengard, 2001a).

La proteína DARPP-32 puede ser fosforilada en la Tre 34 (DARPP-32_{pTre34}) por PKA en respuesta a la señalización a través de D1 (Greengard, 2001a). Esta fosforilación convierte a DARPP-32_{pTre34} en un potente inhibidor de la proteína fosfatasa 1 (PP1),

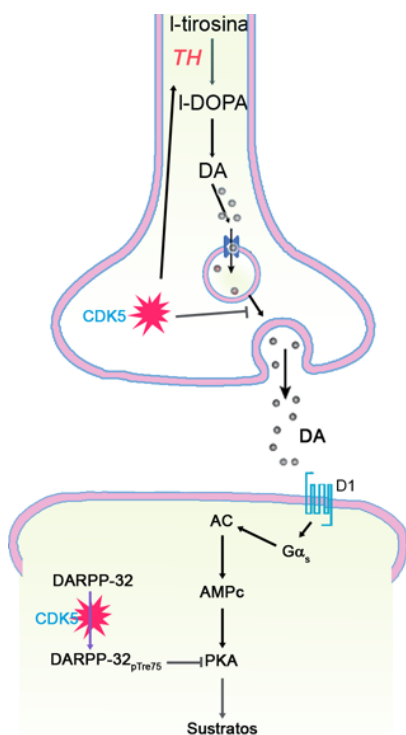


Figura 14: Participación de CDK5 en la regulación de la función dopaminérgica. TH: tirosina hidroxilasa. DA: dopamina. AC: adenilato ciclasa. AMPc: adenosina monofosfato cíclica. PKA: proteína quinasa A. Fosfoproteína regulada por dopamina y AMPc, de peso molecular 32kDa

responsable de desfosforilar a sustratos de PKA (Hemmings y *col.*, 1984). Esta inhibición resulta en la estabilización de los residuos fosforilados por PKA, aumentando la eficiencia de la señalización a través de D1/AMPC/PKA (Figura 15).

Los niveles de fosforilación en la Tre34 pueden ser disminuidos por medio de la activación de receptores D2 en neuronas que coexpresan receptores D1 y D2, en respuesta a la inhibición de los niveles de AMPC/PKA (Nishi y *col.*, 1997; Lindskog y *col.*, 1999). Además, DARPP-32_{pTre34} es desfosforilada por la fosfatasa PP2B, la cual es activada por la entrada de Ca²⁺ mediada por receptores NMDA (Halpain y *col.*, 1990), indicando que DARPP-32 funcionaria también como un integrador entre señales dopaminérgicas y glutamatérgicas.

Por otro lado CDK5, fosforila a DARPP-32 en la Tre 75 (DARPP-32_{pTre75}), lo que previene la fosforilación de esta última por PKA. Además, esta fosforilación convierte a DARPP-32_{pTre75} en un potente inhibidor de PKA (Bibb y *col.*, 1999). Esto produce una atenuación de la señalización de la vía a través de D1, tanto al inhibir PKA como al liberar a PP1 de su inhibición, permitiendo a este último desfosforilar a los sustratos de PKA y evitando la propagación de la señal iniciada por D1 (Nishi y *col.*, 2000). Finalmente PKA activa a PP2A, la cual desfosforila a DARPP-32_{pTre75} (Nishi y *col.*, 2000). Estos datos demuestran que CDK5 es un importante regulador de la señalización dopaminérgica, regulando la señalización a través de PKA y que además existe un equilibrio dinámico y antagónico entre CDK5 y PKA el cual es integrado mediante la proteína DARPP-32 (Nishi y *col.*, 2000).

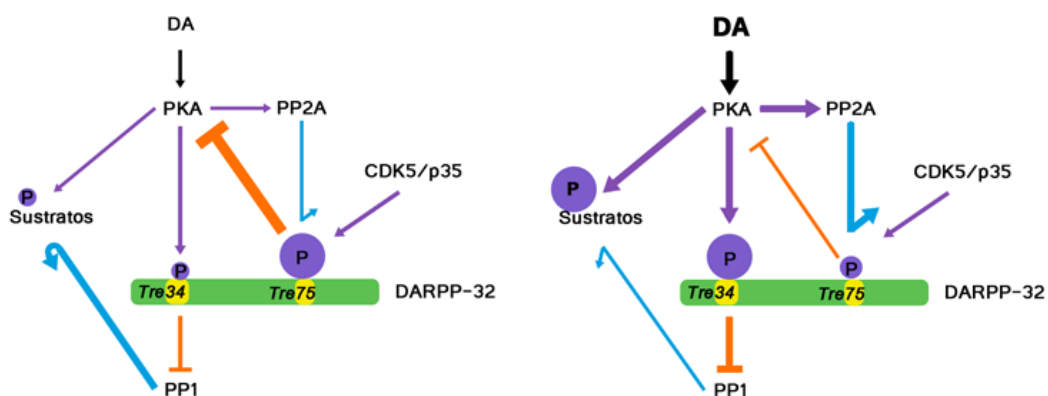


Figura 15: Regulación de la eficiencia de la neurotransmisión dopaminérgica por medio de la proteína DARPP-32. El gráfico señala como dopamina regula a DARPP32 y a la vez como DARPP32 puede regular a DA. Se observa que tanto PKA como CDK5 convergen en DARPP32, donde se observa la existencia de un equilibrio dinámico y antagónico entre CDK5 y PKA. DA: dopamina. PKA: proteína quinasa A. PP1:proteína fosfatasa 1. PP2B: proteína fosfatasa 2. P: fosfatos. Tre34: treonina 34. Tre75: treonina 75. Modificado de Nishi y *col.*, 2000.

CDK5 en aprendizaje y memoria.

CDK5 participa en procesos de aprendizaje y memoria, especialmente modulando mecanismos de plasticidad sináptica. CDK5 actúa en el establecimiento de aprendizajes asociativos dependientes de hipocampo, medido como condicionamiento de miedo dependiente del contexto y mediante el aprendizaje de claves contextuales en el laberinto de Morris, pero no en aprendizajes dependientes de amígdala como el condicionamiento a un tono (Fischer y *col.*, 2005). Se ha demostrado que la activación transitoria de CDK5 mediada por p25 durante periodos cortos de tiempo, facilita la adquisición de aprendizajes condicionados al ambiente; este proceso sería mediado por un aumento de la función del receptor NMDA debido a la activación de CDK5; lo que coincide con un aumento en la inducción de LTP, un tipo de plasticidad sináptica relacionada con la formación de memorias (Fischer y *col.*, 2005). Además, se ha demostrado que la actividad de CDK5 se encuentra aumentada durante procesos de aprendizaje contextual. Complementario a esto, ha sido demostrado que la inhibición farmacológica de CDK5 bloquea la inducción de LTP dependientes de NMDA (Fischer y *col.*, 2002) y que ratones p35KO presentan problemas de aprendizaje espacial y un umbral aumentado para la generación de LTP (Cheung y *col.*, 2006).

Además, se ha propuesto que CDK5 participaría en la formación de nuevos aprendizajes a través de la formación de nuevas sinapsis, por medio de la regulación de componentes del citoesqueleto relacionados con estos procesos (Fischer y *col.*, 2005).

Por otro lado, se ha citado que CDK5 inhibe el proceso de extinción de aprendizaje de miedo condicionado al ambiente. En situaciones basales, CDK5 inhibiría procesos de extinción al encontrarse unida a membranas, donde bloquea la función de PAK1. La actividad de PAK1 es crucial en procesos de extinción al permitir la remodelación de conexiones sinápticas previamente formadas. Durante la extinción, con el trascurso del tiempo, la falta de estimulación de CDK5 produciría que esta se disocie de la membrana, separándose de PAK1 y liberando a esta de su tono inhibitorio, permitiendo así la iniciación o facilitación de la señalización relacionadas con la extinción de aprendizajes (Sananbenesi y *col.*, 2007).

CDK5 en sensibilización y a adicción a psicoestimulantes.

Se ha demostrado que CDK5 participa en mecanismos de adicción y sensibilización a drogas de abuso, especialmente a psicoestimulantes. Es conocido que todas las drogas de abuso producen aumentos de la liberación de DA en Str y NAc, lo que está relacionado con

los procesos que desencadenan en adicción y sensibilización (Benavides y Bibb, 2004). Algunos autores han propuesto que el abuso de drogas puede ser considerado como un aprendizaje aberrante a través de mecanismos de plasticidad mediados principalmente por DA. CDK5 participaría en estos procesos ejerciendo su modulación de la función dopaminérgica por medio de la proteína DARPP-32 (Bibb y *col.*, 2001; Nestler, 2001).

Los psicoestimulantes como COC y ANF actúan al inhibir la remoción de DA del espacio sináptico, produciendo un incremento de ésta en la cavidad sináptica. Este aumento de la cantidad de DA estimula la fosforilación de DARPP-32_{pTre34} por medio de la señalización a través de D1/PKA; la fosforilación de DARPP-32_{pTre34} es necesaria para los efectos a corto y largo plazo inducidos por este tipo de drogas (Zachariou y *col.*, 2006). Esto produce a la vez un aumento en la actividad de CDK5, la cual fosforila a DARPP-32_{pTre75} con el fin de restablecer el balance en la señalización dopaminérgica. Este hecho es apoyado por la observación que los inhibidores de CDK5 aumentan la respuesta a COC o ANF (Bibb y *col.*, 2001).

Por otro lado, administraciones repetidas de psicoestimulantes producen un aumento de los niveles del factor de transcripción Δ FosB que tiene entre otros blancos al gen de CDK5, incrementando de forma perdurable los niveles de síntesis de CDK5 y p35 (Bibb y *col.*, 2001). Esta desregulación de los niveles de CDK5/p35 producen un aumento crónico de la actividad de este complejo, produciendo a la vez, mayores niveles de DARPP-32_{pTre75} (Takahashi y *col.*, 2005). Esto último se traduce funcionalmente en una menor capacidad de la DA en activar a PKA, lo cual produce cambios permanentes en el estado de fosforilación de los sustratos de esta quinasa. Además, se ha citado que exposiciones prolongadas a COC y ANF producen aumentos en espinas y ramificaciones dendríticas, lo que estaría relacionado con cambios adaptativos a largo plazo (Robinson y Kolb, 1999, 2004).

Por otro lado, se ha demostrado que CDK5 no solo participaría en el establecimiento de la adicción sino también en procesos más rápidos como la sensibilización a psicoestimulantes. Sensibilización se refiere al aumento progresivo y persistente del efecto producido por un psicoestimulante en respuesta a las sucesivas administraciones (Vanderschuren y Pierce, 2010). Este es un proceso muy rápido, el cual puede observarse luego de una única dosis de ANF o dos de COC (Vanderschuren y *col.*, 1999; Valjent y *col.*, 2010). Se ha demostrado que CDK5 participa activamente en procesos de sensibilización a

AMF a través de un aumento transitorio de los niveles de p25, acompañado de un aumento de los niveles de PAK1, los cuales podrían estar relacionados con los cambios estructurales adaptativos responsables del establecimiento de la sensibilización (Mlewski y *col.*, 2008).

OBJETIVOS E HIPOTESIS.

OBJETIVO GENERAL.

El conjunto de resultados obtenidos, durante las últimas décadas, en relación a la patofisiología del TDAH convergen en señalar que disfunciones en el sistema dopaminérgico serían las responsables en el establecimiento de los mecanismos neuronales aberrantes que producirían este trastorno.

Gran cantidad de evidencias indican que el complejo CDK5/p35 es un componente clave en la señalización dopaminérgica. A través de la regulación de la neurotransmisión dopaminérgica, CDK5 podría modular funciones complejas como locomoción, atención, aprendizaje y memoria; funciones que suelen estar alteradas en el TDAH. Además, se ha demostrado que CDK5 participa en la modulación de los efectos a corto y largo plazo de la administración de psicoestimulantes, el tipo de fármacos más ampliamente utilizados en el tratamiento de este trastorno. Estas observaciones nos motivaron a pensar que las alteraciones en la función de CDK5, actuando a través de componentes de la maquinaria sináptica dopaminérgica, podrían estar relacionadas con los mecanismos neurobiológicos que producen los comportamientos típicos encontrados en el TDAH.

Dada la alta prevalencia del TDAH en niños de edad escolar y adolescentes y teniendo en cuenta que su etiología es aún desconocida, consideramos que es de gran importancia indagar acerca de los eventos y mecanismos celulares y moleculares que subyacen al desarrollo de este tipo de desorden. Así, la aproximación a la reproducción de esta neuropatología, mediante el uso de un modelo animal que implica la alteración en la función del complejo CDK5/p35 que podría recapitular aspectos clínicos, constituye una herramienta muy poderosa para el estudio de los mecanismos celulares y moleculares relacionados a este síndrome.

Con estas consideraciones en mente, el objetivo general de esta tesis fue estudiar la posible asociación entre el complejo CDK5/p35 y el Trastorno por Déficit de Atención con Hiperactividad por medio del estudio conductual, bioquímico y farmacológico de un ratón genéticamente modificado (knock-out, KO) que carece del activador p35 (ratón p35KO).

HIPÓTESIS

La hipótesis general de este trabajo es que la alteración de la función del complejo CDK5/p35 provoca un desbalance en la homeostasis de la transmisión sináptica dopaminérgica, lo que produce en el ratón p35KO el surgimiento de una serie de comportamientos aberrantes similares a los encontrados en diferentes modelos animales del Trastorno por Déficit de Atención con Hiperactividad, recapitulando características clínicas, bioquímicas y farmacológicas de este desorden.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- (1) Comparar la actividad locomotora espontánea de ratones tipo salvaje (WT, controles) y p35KO tanto juveniles como adultos
- (2) Estudiar el efecto de la administración de diferentes dosis de los psicoestimulantes d-anfetamina y metilfenidato sobre el perfil locomotor de ratones de ambos genotipos.
- (3) Evaluar si los ratones p35KO presentan menor inhibición comportamental y/o ansiedad
- (4) Valorar los efectos de la pérdida de función de la proteína p35 en la síntesis y acumulación de DA en Str de ratones p35KO juveniles y adultos y su modulación por psicoestimulantes.
- (5) Estudiar los niveles de DOPAC como un indicador de la utilización de DA en los ratones p35KO juveniles y adultos, tanto en condiciones basales como luego del tratamiento con psicoestimulantes.
- (6) Analizar el efecto de la activación y de la inhibición farmacológica de los receptores dopaminérgicos D1 en la actividad locomotora de ratones p35KO juveniles.
- (7) Determinar las consecuencias de la activación e inhibición farmacología de los receptores de DA D2 en la actividad locomotora de ratones p35KO juveniles.

MATERIALES y METODOS

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Cría y mantenimiento

La cría y el mantenimiento de los animales de experimentación se realizó en el Bioterio del Instituto de Investigación Medica Mercedes y Martín Ferreyra. Los ratones fueron mantenidos con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, con el encendido de las luces a las 8 horas y el apagado a las 20 horas, con temperatura constante de 22°C y acceso libre a comida y agua. Los animales se alojaron en cajas de plástico o plexiglás las cuales se cambiaron dos veces a la semana por cajas limpias y viruta fresca. Los animales se mantuvieron con ambos progenitores hasta el destete, el día 21 postnatal y se mantuvieron separados por sexo hasta el día de experimentación. En esta tesis solo se utilizaron animales machos.

Durante la realización de los experimentos comprendidos en las secciones 1, 2 y 3 de Resultados, los animales fueron mantenidos en cajas estándar de plástico opaco de (30x40x25 cm ancho/largo/alto) cerradas por una reja superior, expuestas al ambiente del bioterio. Sin embargo, debido a construcción de un nuevo bioterio y a las reformas del bioterio existente, los ratones utilizados para los experimentos comprendidos en la sección 4 de Resultados, se criaron y mantuvieron hasta el día del destete en condiciones libres de patógenos. Esto se realizó mediante cajas microaisladas cerradas herméticamente (20x32x13 cm ancho/largo/alto), de plexiglás semitransparente, con un suministro individual por caja de aire estéril a través de filtros HEPA®. Todos los elementos utilizados en el mantenimiento de estos animales, incluidos agua, comida, virutas y las cajas de alojamiento, fueron previamente esterilizados. Además, con el fin de asegurar las condiciones sanitarias de los ratones, todas las manipulaciones de estos se realizaron dentro de una mesa de flujo laminar.

Ratones transgénicos

En esta tesis se utilizó una cepa de ratón genéticamente modificado que carece (knock-out, KO) de la proteína p35 (p35KO). Esta mutación consiste en una sustitución completa de la región del gen CDK5r1 que codifica para la proteína p35, por un "cassette" que le confiere resistencia al antibiótico neomicina (Figura 16). Esta mutación produce un

transcripto trunco, carente de función y rápidamente degradable, que funcionalmente resulta en la pérdida de la proteína p35 (Chae *y col.*, 1997).

Los ratones p35KO fueron un generoso regalo a nuestro laboratorio por parte de la doctora Li-Hue Tsai. Estos fueron generados en un fondo o “background” genético híbrido 129/Sv-C57Bl/6 y fueron posteriormente retrocruzados hasta obtener el background puro de la cepa C57Bl/6 (Chae *y col.*, 1997).

Como animales control se utilizaron ratones del tipo salvaje (WT). Tanto los ratones p35KO como WT utilizados en esta tesis, provienen de la cepa C57Bl/6J, conteniendo un 100% del “background” genético de dicha cepa.

El mantenimiento de la colonia de ratones para experimentación, se realizó mediante cruzamientos entre ratones heterocigotas para la mutación en el gen de p35. A partir de estos cruzamientos se obtuvieron tanto los animales parentales como de experimentación.

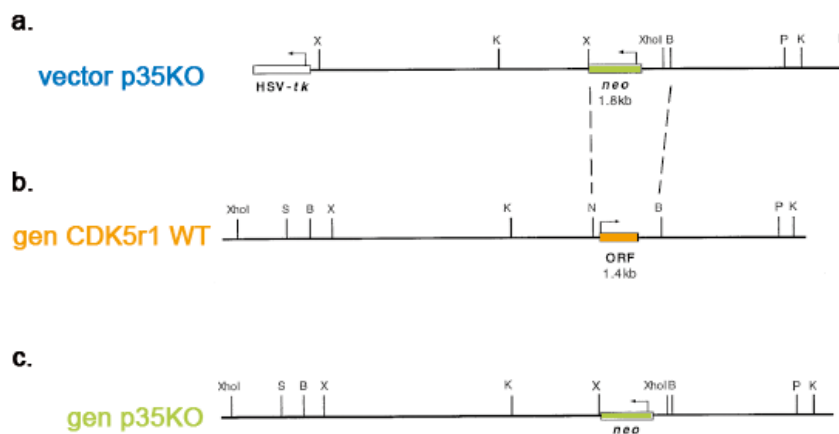


Figura 16: Esquema de generación del ratón p35KO. a. Vector conteniendo el “casette” de neomicina (neo). b. Gen CDK5r1 endógeno, que codifica para la proteína p35, mostrando el marco de lectura abierto (ORF). Las líneas punteadas indican homología de secuencias entre el vector y el gen endógeno. c. Gen mutado donde el ORF fue reemplazado por el “casette” de neo. Modificado de Chae *y col.*, 1997.

GENOTIPIFICACIÓN DE LOS RATONES p35KO y WT.

La genotipificación de los ratones se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de ADN genómico obtenido de una muestra de tejido de la cola del animal. La toma de la muestra de tejido de los animales usados como

parentales se llevó a cabo dentro de la primera semana después del destete de los mismos, mientras que los animales utilizados en los experimentos fueron genotipificados al finalizar los mismos.

Obtención de la muestra de tejido

La toma de la muestra de tejido se realizó en animales anestesiados con una dosis de 90 mg/kg de ketamina y 10 mg/kg de xilazina diluidas en solución salina estéril (Sal, NaCl 0,9%), inyectada intraperitonealmente (i.p.). El estado de anestesia profunda se comprobó mediante la ausencia de un reflejo flexor al ejercer una pequeña presión en el extremo de la cola del animal. A continuación, mediante un bisturí estéril se cortó una muestra de aproximadamente 2-3 mm del extremo de la cola del ratón, e inmediatamente se cauterizó dicha zona. Adicionalmente, con el animal aún anestesiado, estos fueron numerados mediante pequeñas incisiones en las orejas para su futura identificación.

Extracción y purificación del ADN genómico

La extracción del ADN genómico a partir de la cola de los ratones se llevó a cabo mediante la digestión del tejido y la posterior purificación del ADN. La digestión se realizó mediante la enzima Proteinasa K (Promega, Oregon, EEUU). Para esto, las muestras de tejido fueron colocadas en un microtubo estéril tipo Eppendorf, con 500 µl del buffer de digestión (200 mM NaCl, 100 mM Tris pH 8,5, 2% SDS y 5 mM EDTA pH 8) al cual se le agregó 0.2 µg de Proteinasa K disuelta en 10 mM CaCl y 50 mM Tris (pH 8) y se incubaron a 55°C durante toda la noche.

A continuación, las muestras fueron centrifugadas a 14.000x *g* a 4°C durante 10 minutos (min), obteniéndose una fase acuosa y un precipitado conteniendo los restos de tejidos no digeridos. La fase acuosa conteniendo el ADN se transfirió a otro microtubo y se le agregó un volumen igual de isopropanol frío; seguido de esto, la muestra se agitó suavemente hasta observar la formación de un pequeño precipitado. Esta muestra se centrifugó nuevamente a 14.000x *g* a 4°C durante un periodo de 10 min y se descartó el sobrenadante, quedando el precipitado de ADN adherido al fondo del tubo. El precipitado se lavó con etanol 80% centrifugandolo 5 min a 14.000x *g* a 4°C y eliminando el sobrenadante; este paso se realizó dos veces, el primero con 500 µl de etanol y el segundo con 200 µl. A continuación, se dejó secar el ADN durante 30 min y luego se agregaron 50 µl de H₂O MilliQ®

autoclavada y se incubó la muestra durante 30 min a 37°C, con el fin de facilitar la resuspensión del ADN. La muestra se guardó en un freezer a -20°C hasta su utilización.

Reacción en Cadena de la Polimerasa

Para determinar el genotipo de los animales, por cada muestra se realizaron dos reacciones diferentes. La primera, revela la presencia del gen de p35 endógeno, para la cual se utiliza un primer (o cebador) denominado Up (3'-ACGCAGATCCGCAGGACTAAAC-5') que hibridiza con los segmentos iniciales del gen de p35 y un segundo primer, designado Down (3'-CAGAGCATGTAGAGGAAGACC-5'), el cual reconoce una secuencia interna del gen en la cadena complementaria a la anterior; esta reacción produce un fragmento de aproximadamente 750 pares de bases (pb). La segunda reacción utiliza, también, el primer UP, ya que la región inicial del gen no se encuentra delecionada en el ratón p35KO, sin embargo, utiliza un primer denominado Neo (3'-GGAGAGGCTATTCGGCTATGACACA-5') el cual hibridiza con el "cassette" de neomicina utilizado para reemplazar el gen de p35 en estos ratones; esto produce la amplificación de un fragmento de aproximadamente de 1300 pb . De acuerdo a esto, en los animales WT solo es positiva la reacción Up/Down, mientras que en los ratones p35KO solo amplifica la reacción Up/Neo. En animales heterocigotas, ambas reacciones son positivas debido a la presencia del gen endógeno y del mutado.

Ambas reacciones se desarrollaron simultáneamente y utilizaron idénticos parámetros de amplificación. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20 µl conteniendo 2,5 mM MgCl₂, 0,25 mM dNTPs, 10 pmoles de cada primer (Up/Down o Up/Neo), 1 unidad de Taq polimerasa y 0,5 ng de ADN. Las reacciones fueron realizadas en un termociclador estándar de acuerdo al siguiente programa: 1-desnaturalización inicial: 2 min a 94°C; 2-desnaturalización: 1 min a 94°C, 3-hibridización:1 min a 54°C; 4-elongación: 2 min a 72°C y 5-Elongación final: 7 min a 72°C. Las etapas 2 a 4 se repitieron por 35 ciclos. Los productos de PCR se revelaron mediante electroforesis en un gel de agarosa 0,8% en Buffer TAE (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA) conteniendo 0,01% (v/v) de bromuro de etidio. La presencia de las bandas de los productos de amplificación fueron detectadas mediante un transiluminador UV.

EXPERIMENTOS CONDUCTUALES

Actividad locomotora espontanea

La actividad locomotora espontanea se midió en animales WT y p35KO en dos edades diferentes: juveniles de 24 días de edad postnatal y adultos entre 60 y 75 días de edad postnatal. Al momento del test los animales juveniles pesaron entre 9-11g, mientras que en los animales adultos el peso osciló entre 50-55g.

Este test se realizo en una sala especialmente acondicionada, ubicada fuera del bioterio, aislada de ruidos exteriores y con condiciones de luz y temperatura idénticas a la de las salas de alojamiento. Los animales fueron trasladados a la sala de experimentación 30 min antes de comenzar el experimento, con el fin de permitirles aclimatarse a su nuevo ambiente. Este experimento fue realizado entre las horas 10:00 a 15:00.

La actividad locomotora fue evaluada en un campo abierto circular de 40 cm de diámetro construido de plexiglas opaco, registrada mediante una cámara de video. A continuación, las grabaciones fueron analizadas sin conocer previamente el genotipo de los animales. El campo abierto se dividió en el monitor en el cual se visualizó, en cuatro cuadrantes idénticos y la actividad se registró como el número de cruces entre estos cuadrantes cada 10 min por un periodo total de 70 min. Al final de cada test las cajas de registro se limpiaron cuidadosamente con una solución de isopropanol 10% (v/v) con el fin de eliminar posibles claves olfativas.

Efectos de los psicoestimulantes en la actividad locomotora.

La respuesta a psicoestimulantes se midió de manera similar a la utilizada en el apartado anterior, utilizando el mismo campo abierto, sala de experimentación y forma de evaluar la actividad locomotora. Este experimento, al igual que el anterior fue llevado a cabo en el horario entre 10:00 a 15:00 horas.

Los animales se colocaron en la caja de registro durante un periodo inicial de 10 min, luego se les administró el tratamiento farmacológico correspondiente y fueron regresados a dicha caja, por 60 min más. La actividad locomotora se registró tanto durante los 10 min previos a la inyección como en los 60 min subsiguientes a ésta.

Cada raton fue tratado con una única inyección de una de 3 dosis diferentes de d-anfetamina sulfato (ANF; Parafarm, Argentina) o tres dosis diferentes de metilfenidato (MTF; Ritalina®, Novartis, Argentina), además se utilizo Sal como control de inyección y vehículo. Las dosis elegidas fueron de 0,2; 0,5 y 1,0 mg/kg de ANF o 0,5; 1,0 y 2,0 mg/kg de MTF; ambas drogas fueron disueltas en Sal y se inyectaron vía i.p. en un volumen de 100 µl cada 10 g de peso del animal.

Se dosis se eligieron de acuerdo al criterio de utilizar dosis bajas, las cuales se encuentren por debajo del umbral de sensibilización comportamental en la bibliografía.

Evaluación del rol de los receptores D1 y D2 en la actividad locomotora.

Este experimento se realizó de manera similar a las anteriores, sin embargo en esta ocasión los test fueron realizados en una sala destinada a experimentos conductuales ubicada dentro del bioterio y fueron realizados entre las horas 14:00 a 19:00. La actividad se registró en el mismo campo abierto y con la misma metodología que en los apartados anteriores.

Con el fin de analizar el rol del receptor de DA D1 se utilizo una dosis de 0,05 mg/kg del antagonista (R)-(+)-7-cloro-8-hidroxi-3-metil-1-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-1H-3-benzacepina hidrocloreuro, "SCH23390" (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EEUU) y 5,0 mg/kg del agonista (±)-6-cloro-2,3,4,5-tetrahidro-1-fenil-1H-3-benzacepina hidrobromuro, "SKF81287" (Tocris bioscience, Bristol, Reino Unido).

Para estudiar el papel de los receptores D2 dopaminérgicos en la actividad locomotora, se utilizó una dosis de 0,5 mg/kg del agonista (4aR-trans)-4,4a,5,6,7,8,8a,9-octahidro-5-propil-1H-pirazolo[3,4-g]quinolina hidrocloreuro, "quinpirole" (QNP) (Tocris bioscience) o dos dosis diferentes de 0,1 mg/kg o 0,03 mg/kg del antagonista 4-[4-(4-Clorofenil)-4-hidroxi-1-piperindinil]-1-(4-fluorofenil)-1-butanona hidrocloreuro, "haloperidol" (HAL) (Tocris bioscience).

Los cuatro fármacos fueron disueltos en Sal e inyectados a los ratones vía i.p., en un volumen de 100 µl cada 10 g de peso. Se utilizo Sal como control de los efectos de la inyección *per se* y del vehículo.

Los animales recibieron los diferentes tratamientos e inmediatamente se colocaron en el campo abierto y la actividad locomotora fue registrada cada 10 min por un periodo total de 60 min.

Laberinto en cruz elevado

El laberinto en cruz elevado (LCE) consiste en un aparato construido de plexiglas opaco, en forma de cruz elevado a 40 cm del suelo. Este está compuesto por dos brazos abiertos y opuestos de 30 cm de largo por 5 cm de ancho cada uno y dos brazos perpendiculares a estos, de las mismas dimensiones, pero cerrados por paredes de 16 cm de alto. Los brazos abiertos no contaban con ningún tipo de baranda o borde.

Este test se llevó a cabo en un cuarto aislado del ruido y en condiciones de luz tenue; los animales fueron llevados a dicha sala 30 min antes de comenzar el test, con el fin de que se habituaran a su nuevo entorno. Este test fue realizado entre las 10:00 y 15:00 horas.

Al comienzo del test cada ratón fue colocado en el centro del laberinto mirando hacia uno de los brazos cerrados. El número de entradas a ambos brazos y el tiempo de permanencia en estos se registró durante un total de 5 minutos, mediante una cámara de video y el posterior análisis del mismo. Se consideró que el animal entró a un brazo cuando las dos patas delanteras del mismo se encontraban dentro de dicho brazo. El análisis de las grabaciones se realizó sin conocer previamente el genotipo de los ratones. Entre cada test, el laberinto en cruz fue limpiado cuidadosamente con una solución de isopropanol 10% (v/v) con el fin de eliminar posibles claves olfativas.

EXPERIMENTOS BIOQUIMICOS

Tinción inmnohistoquímica de la enzima tirosina hidroxilasa

Ratones p35KO y WT fueron anestesiados con una sobredosis de hidrato de cloral (0,1 ml/100g) y luego de comprobarse que estos se encontraban profundamente anestesiados mediante la ausencia de reflejos flexores, fueron perfundidos transcárdiacamente con el fin de fijar el tejido cerebral. Para esto, en primer lugar, los animales fueron perfundidos con una solución lavadora (0,8% sacarosa, 0,4% NaCl y 0,4% glucosa) con el fin de remover toda la sangre del sistema. A continuación los ratones fueron perfundidos con una solución fijadora de 4% de paraformaldehído (Riedel-de Haen, Sigma-Aldrich Lab GmbH, Seelze, Alemania) en buffer borato (10mM Na₂B₄O₇, 150 mM NaCl, pH 7.5). Los cerebros fijados permanecieron dentro del cráneo, envueltos en papel aluminio,

durante toda la noche a 4°C y luego fueron removidos y colocados en una solución de sacarosa 30%. Seguido de esto, los cerebros fueron cortados coronalmente cada 40 µm, mediante un micrótopo de congelación (Reicher-Jung Hn40, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) y las secciones fueron recolectadas de manera serial y procesadas para inmunohistoquímica.

Las secciones fueron lavadas tres veces en buffer KPBS (137mM NaCl, 10mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl y 2mM KH₂PO₄) para remover los restos de fijador. Previo a la inmunotinción, las secciones fueron colocadas en una solución de 3% de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y 10% metanol durante 60 min con el fin de eliminar las peroxidasa endógenas.

Luego, los cortes, fueron colocadas en un buffer de bloqueo conteniendo 5% de suero normal equino (NHS) en buffer KPBS. Seguido de esto, las secciones fueron transferidas directamente a una solución conteniendo el anticuerpo monoclonal anti-tirosina hidroxilasa (anti-TH) (clon LNC1, generado en ratón, Chemicon int., Bellerica, MA, EEUU) diluido 1:1000 en 1% NHS, 0,05% Tritón X 100 en KPBS, en agitación suave, a 4°C, durante 48 hs.

Luego de la incubación, las secciones fueron lavadas 3 veces con buffer fosfato salino (PBS, 145 mM NaCl, 90 mM Na₂HPO₄ y 13 mM NaH₂PO₄) y se colocaron durante 2 hs en una solución de 1% NHS en PBS, conteniendo 1:100 de un anticuerpo biotinilado anti-IgG de ratón (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EEUU). A continuación, las secciones se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con un complejo avidina/peroxidasa (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories) en PBS con 1% NHS por 2 hs. Seguido de esto, las secciones se lavaron 2 veces en PBS y se sumergieron en una solución de 0,05% 3,3'diaminobenzidina tetrahidrocloruro y 0,005% H₂O₂ para visualizar el producto de reacción. La reacción se detuvo con PBS y las secciones marcadas fueron colocadas sobre cubreobjetos. A continuación, las preparaciones fueron deshidratadas en una solución de xileno y se montaron mediante el medio de montaje DPX (Fluka, Biochemika, Sigma Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Alemania). Las secciones fueron luego examinadas mediante un microscopio Olympus CX40 (Tokyo, Japón).

Análisis por western blot de los niveles de tirosina hidroxilasa.

Ratones p35KO y WT fueron sacrificados mediante decapitación y el cerebro fue rápidamente removido sobre hielo. Del cerebro de los animales se disecó Str y NAc y éstos se homogenizaron en buffer RIPA (50 mM Tris pH 7,5 , 150 mM NaCl, 1% Triton X 100, 0,1% dodecil sulfato de sodio (SDS) y 0,5% deoxicolato de sodio), conteniendo un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas (1 ug/ml aprotinina, 1 ug/ml leupeptina, 1 ug/ml pepstatina A, 100 ug/ml fenilmetilsulfonilfluoro (PMSF), y 0,2 mM ortovanadato de sodio; Sigma-Aldrich), en un volumen final de 200 y 400 μ l de RIPA frio, para NAc y Str respectivamente, con un homogeneizador con embolo de vidrio dentro de un recipiente de hielo.

Las muestras homogeneizadas se centrifugaron durante 15 min a 14.000 x g y se recuperó el sobrenadante. A partir de éste, se determino la concentración de proteínas totales mediante el método de Lowry, utilizando un kit comercial (DC Protein Assay Kit, Bio-Rad Laboratory, Hercules, CA, USA) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. A continuación, se agregó a las muestras de proteínas una cantidad de Laemmli 4X (8% SDS, 40% glicerol, 20% 2-mercaptoetanol y 0.01% azul de bromofenol) equivalente a 0,25 volúmenes de muestra y estas se incubaron durante 5 min a 100°C.

A continuación, 25 μ g de proteína total por muestra fueron separados mediante electroforesis en geles de 10% de acrilamida/bisacrilamida conteniendo 10% de SDS. La electroforesis se realizó en un buffer conteniendo 25 mM Tris, 192 mM glicina y 1 % SDS, y el gel fue corrido electrofóreticamente a un voltaje constante de 150V, durante aproximadamente 90 min, hasta que el frente de corrida del mismo desapareciera. Una vez finalizada la electroforesis, las muestras fueron transferidas desde el gel a membranas de Polivinildeno difloruro (PVDF, Amersham Life Science, Buckinghamshire, Reino Unido) en un buffer igual al usado en el paso anterior, pero conteniendo 20% de metanol. La trasferencia se llevo a cabo durante 90 minutos a un amperaje constante de 270 mA. Una vez transferidas las proteinas, las membranas fueron teñidas con una solución de 0.2% Ponceau S (Sigma Aldrich) y 2% de ácido acético con el fin de visualizar la correcta transferencia y fueron posteriormente lavadas con buffer tris salino (TBS, 20 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl) hasta que las marcas desaparecieran completamente.

Seguido de esto, las membranas fueron bloqueadas con 5% de leche descremada en polvo en TBS con 0,05% Tween 20 (TBS/Tween) durante 1 hs, con el fin de evitar uniones inespecíficas del anticuerpo con la membrana. A continuación, se incubaron toda la noche a 4º con el anticuerpo anti-TH diluido 1:1000 en 1% de leche en TBS/Tween. Luego de la incubación, el anticuerpo fue removido y las membranas recibieron tres lavados de 15 minutos con TBS/Tween.

Seguido de esto, las membranas fueron incubadas con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa anti-IgG de ratón (anti-mouse IgG-HRP, Jackson ImmunoResearch Laboratory, West Grove, PA, EEUU) en una dilución 1:2000, en 1% leche en TBS/Tween durante 1 hs a temperatura ambiente y luego se lavaron nuevamente 3 veces con TBS/Tween. Finalmente, las membranas fueron reveladas mediante quimioluminiscencia utilizando un kit comercial (ECL, Amersham Life Science). La presencia de las bandas se detectó mediante autoradiografía utilizando placas radiográficas de uso médico (Agfa X ray film, Buenos Aires, Argentina).

Una vez concluida la etapa anterior, se procedió a la remoción de los anticuerpos primarios de la membrana mediante una incubación de 5 min en una solución de 5N NaOH. Luego, la membrana se lavó 5 veces con TBS/Tween y se incubó durante una hora, a temperatura ambiente, con un anticuerpo anti α -tubulina total generado en ratón (clon DM1A, Sigma-Aldrich), en una dilución 1:2000 en TBS/Tween. A continuación la membrana fue lavada 3 veces y revelada mediante quimioluminiscencia y autoradiografía de la misma forma mencionada en el paso anterior.

Las autoradiografías fueron luego digitalizadas por medio de un scanner y el análisis densitométrico de las bandas se realizó mediante el uso del software Scion Image for Windows (Scion Corporation Frederick, MD, EEUU). Los valores densitométricos de TH se normalizaron con respecto a los de α -tubulina y dichos valores fueron utilizados para el posterior análisis estadístico.

Determinación de los niveles de DA, DOPAC y l-DOPA.

Los niveles de DA y DOPAC se midieron en ratones WT y p35KO juveniles y adultos. Esta determinación se realizó tanto en condiciones basales (es decir en animales que no

recibieron ningún tipo de tratamiento), como así también en animales tratados con ANF o MTF.

Para determinar el efecto de los psicoestimulantes en los niveles de DA y DOPAC, los ratones p35KO y WT fueron tratados con una dosis vía i.p. de 0,5 mg/kg ANF, 0,5 mg/kg MTF o Sal, 30 min antes de ser sacrificados.

Para determinar los niveles de l-DOPA, esta se midió 30 minutos después de que los ratones recibieran una dosis del inhibidor 3-hidroxibencilhidracina dihidrocloruro, “NSD-1015” (Sigma-Aldrich), el cual bloquea la conversión de l-DOPA a DA. Esta determinación se llevo a cabo solo en animales juveniles.

La determinación de DA, DOPAC y l-DOPA se realizó con la misma metodología. Los animales fueron sacrificados por decapitación y el Str fue rápidamente removido en hielo y pesado en una balanza ultra sensible. El Str fue homogeneizado y desproteinizado en 400 µl de 0,2 M ácido perclórico (H₂PO₄) en un homogenizador con émbolo de vidrio. Las muestras obtenidas fueron centrifugadas a 14.000x g durante 15 min a 4°C y el sobrenadante se filtró a través de membranas de PVDF de 0,22 µm de poro (Millipore, Sao Paulo, SP, Brazil).

Los niveles de DA, DOPAC y l-DOPA fueron analizados mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con detección electroquímica. Solo para la detección de DA, se realizó previamente una extracción en óxido de aluminio estandarizada para adsorción cromatografica (Revol y col., 1994). DA, DOPAC y l-DOPA fueron separados en una columna de fase reversa (Zorbax Eclipse XDB, C-8, 4.6 x 150 mm, 3,5 µm, Agilent Technologies, Inc. Santa Clara, CA, EEUU) con una fase móvil compuesta de 0,03 M ácido cítrico monoclora-acético, 0,1 mM EDTA, 5 mM KCl y 3% acetonitrilo (pH 3,2). La tasa de flujo fue de 0,8 ml/min y se detectó mediante un electrodo de 3 mm de vidrio/carbono (HP 1049) a +0,75V. El volumen de inyección fue de 80 µl y el cromatograma resultante fue analizado a través de la interfase HP 1100 ChemStation (Agilent Tech, inc.)

ANALISIS ESTADISTICO.

Los análisis estadísticos utilizados fueron realizados mediante el software Statistica, versión 7.0 (Statsoft inc., Tulsa, OK, EEUU). Los test estadísticos realizados se describen conjuntamente con los resultados. En todos los casos se utilizaron análisis de la varianza

(ANOVA) y el número de vías de estos dependió del número de factores y del diseño de cada experimento. El test *a posteriori* de Duncan fue utilizado como prueba *post hoc* en todos los casos en las que éstas fueran necesarias. Valores $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Todos los resultados se expresan como la media de las mediciones \pm error estándar de la media.

RESULTADOS

SECCION 1: CARACTERIZACIÓN CONDUCTUAL DEL RATON p35KO.

1.1 Los ratones p35KO exhiben hiperactividad locomotora a edades juveniles.

Se analizó la actividad locomotora espontanea en ratones p35KO y WT juveniles, de 24 días de edad y adultos, de entre 60 y 75 días, en el paradigma de campo abierto durante 70 min. El análisis de la actividad locomotora a lo largo del test se realizó mediante un ANOVA de dos vías (genotipo x edad). Este ANOVA reveló un efecto principal del genotipo ($F(1,18)=30,415$ $p<0,001$), de la edad ($F(1,18)=49,052$, $p<0,001$) y de la interacción entre ambos factores ($F(1,18)=21,344$ $p<0,001$). El uso del test *a posteriori* de Duncan indicó un aumento estadísticamente significativo en la actividad locomotora de los ratones juveniles p35KO con respecto a los animales WT ($p<0,001$). Además, este test demostró que la actividad locomotora total de los ratones p35KO juveniles es mayor que la de los ratones p35KO adultos ($p<0,001$). A su vez, no se encontraron diferencias significativas entre los animales p35KO y WT adultos ni tampoco entre los ratones WT de ambas edades (Figura 17a). En este experimento se utilizaron en total 6 ratones p35KO adultos, 4 WT adultos, 6 p35KO juveniles y 6 WT juveniles.

Para evaluar si el patrón de la actividad locomotora a lo largo del tiempo difiere entre ratones p35KO y ratones WT, esta se analizó cada 10 min a lo largo de los 70 min del test, en las dos edades por separado. Estos datos se analizaron mediante un ANOVA dos vías de medidas repetidas (genotipo x tiempo) y las posibles diferencias en cada tiempo se determinaron mediante un ANOVA de una vía entre ambos genotipos (Figuras 16b y 16c).

En ratones juveniles, se observó un efecto principal de genotipo ($F(1,10)=37,273$ $p<0,001$), de tiempo ($F(6,60)=2,325$, $p=0,044$) y la interacción entre ambos factores ($F(6,60)=5,383$ $p<0,001$). Con respecto a la variación de la actividad locomotora en ratones p35KO a lo largo del test, se observó un aumento en la actividad locomotora entre los minutos 20 al 40 con respecto al tiempo inicial, como se comprobó mediante el test *a posteriori* de Duncan (todos los $p<0,022$), mientras que en los tiempos restantes (50-70 min)

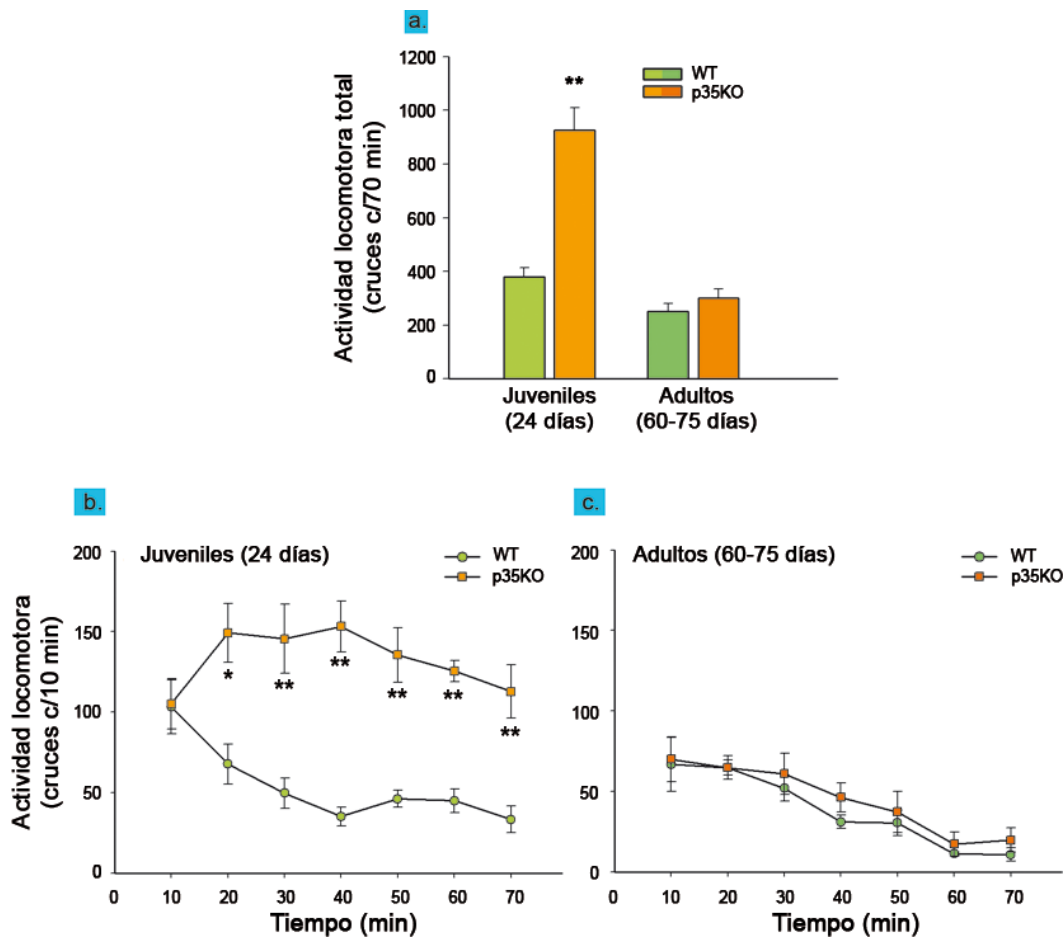


Figura 17: Actividad locomotora de ratones p35KO y WT. **a.** Actividad locomotora espontánea total de ratones p35KO y WT juveniles y adultos durante 70 minutos de evaluación. Las barras representan la media de la actividad locomotora de los ratones. Un ANOVA de dos vías (genotipo: $F(1,18)=30,415$ $p<0,001$); edad ($F(1,18)=49,052$, $p<0,001$); interacción ($F(1,18)=21,344$ $p<0,001$), seguido por el test a posteriori de Duncan indicó diferencias significativas entre ratones p35KO y WT juveniles ($p<0,001$) y entre ratones p35KO juveniles con respecto a los adultos ($p<0,001$). **b.** y **c.** Curva temporal de la actividad locomotora de los ratones p35KO y WT juveniles (b.) y adultos (c). Cada punto representa la media de la actividad en intervalos de 10 minutos. El análisis estadístico indica diferencias significativas a partir de los 10 min entre ratones juveniles de ambos genotipo (ANOVAS de una vía individuales en cada tiempo, todos los $F>13,589$ y todos los $p<0,05$), sin embargo en ratones adultos no se encuentran diferencias en ningún tiempo. WT: juveniles: WT $n=6$, p35KO $n=6$; adultos WT $n=4$, p35KO $n=6$. Las barras de error representan el error estándar de la media * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

no se observaron diferencias significativas con respecto al primer intervalo de tiempo, indicando que la actividad locomotora de estos ratones se mantiene elevada a lo largo de

todo el test. Por otro lado, en los animales WT, se observó una disminución de la actividad locomotora a medida que progresó el tiempo de la evaluación, en el cual el test a *posteriori* de Duncan indicó diferencias significativas entre el tiempo 10 min y todos los periodos de tiempo siguientes (todos los $p < 0,027$), pero no encontrándose diferencias entre estos tiempos, lo cual indica que los ratones WT experimentan una disminución de su actividad locomotora de los primeros 10 min test y se mantiene baja durante todo el tiempo restante (Figura 17b).

Finalmente, se comparó la actividad locomotora entre los ratones p35KO y WT en cada intervalo temporal, para esto se realizaron ANOVAs de una vía (genotipo) individuales en cada tiempo. Este análisis indicó que la actividad locomotora de los ratones p35KO es mayor a la de los ratones WT durante todo el test, excepto en los 10 min iniciales (todos los $F > 13,589$ y todos los $p < 0,05$) (Figura 17b), lo cual se complementa con la observación anterior, indicando que durante todo el test la actividad locomotora de los ratones p35KO se mantiene elevada.

En contraste a lo anterior, el análisis de la curva temporal de actividad locomotora de ratones adultos solo señaló un efecto del factor tiempo ($F(6,48) = 15,951$ $p < 0,001$, ANOVA de dos vías, medidas repetidas), pero no así de genotipo, ni de la interacción entre ambos factores. En estos ratones, se observa que la actividad locomotora presenta una tendencia a disminuir a medida que progresa el tiempo del test en ambos genotipos (Figura 17c).

1.2. Los ratones p35KO responden de manera paradójica a psicoestimulantes.

Los fármacos que afectan la neurotransmisión dopaminérgica como ANF o MTF producen una disminución de la actividad locomotora en ratas y ratones utilizados como modelos de TDAH (Sagvolden y *col.*, 2005b). Teniendo esto en cuenta, decidimos evaluar los efectos de estos psicoestimulantes en la actividad locomotora de ratones p35KO y WT. Para esto, tratamos a ratones de ambos genotipos con tres dosis de ANF (0,2; 0,5 y 1,0 mg/kg), tres dosis de MTF (0,5; 1,0 y 2,0 mg/kg) y Sal como control. En este experimento se utilizaron en total 48 ratones p35KO y 38 WT, distribuidos de la siguiente manera: Sal, 6 p35KO, 6 WT; ANF 0,2: 6 p35KO, 7 WT; ANF 0,5: 6 p35KO, 7 WT; ANF 1,0: 10 p35KO, 6 WT. MTF 0,5: 8 p35KO, 5 WT; MTF 1,0: 6 p35KO, 5 WT, MTF 2,0: 6 p35KO, 4 WT.

En los animales tratados con ANF, un ANOVA de dos vías (genotipo x tratamiento) evidenció un efecto principal del genotipo ($F(1,44)=32,905$ $p<0,001$), del tratamiento ($F(3,44)=3,341$ $p=0,028$) y de la interacción entre genotipo y el tratamiento ($F(3,44)=25,381$ $p<0,001$). El test *a posteriori* de Duncan reveló que el tratamiento con las tres dosis diferentes de ANF, produjo un marcado aumento en la actividad locomotora total de los ratones WT comparados con los administrados con SAL (todos los valores $p<0,01$), lo cual se corresponde con el resultado esperado para este tipo de fármacos. Por otro lado, cuando animales p35KO fueron administrados con las tres dosis diferentes de ANF, se observó una gran inhibición de la actividad locomotora con respecto a los animales tratados con Sal (test *a posteriori* Duncan test, todos los $p<0,01$) (Figura 18a).

A continuación, cuando se analizaron los efectos de la administración de MTF, se observaron resultados similares a los obtenidos con ANF. A través de un ANOVA de dos vías se detectó un efecto principal del genotipo ($F(1,38)=107,823$ $p<0,001$) y la interacción entre genotipo y tratamiento ($F(3,38)=62,159$ $p<0,001$), pero no se encontró un efecto principal para el factor tratamiento. En la figura 18b y como se desprende del análisis *a posteriori de* Duncan, se observa que las 3 dosis de MTF producen un aumento estadísticamente significativo en la locomoción en ratones WT ($p<0,01$ en todas las dosis); mientras que estas mismas dosis indujeron una fuerte disminución, estadísticamente significativa, de la actividad locomotora en ratones p35KO con respecto a los tratados con Sal ($p<0,01$ en todas las dosis).

Seguido a esto, se analizó la dinámica del efecto de los psicoestimulantes tanto en ratones p35KO como WT a lo largo de los 70 min de evaluación, mediante el registro de la actividad locomotora cada 10 min. Este análisis se realizó mediante una ANOVA de dos vías (genotipo x tratamiento) de medidas repetidas (factor tiempo). Al analizar la curvas temporales de la respuesta a psicoestimulantes, se encontró que el comportamiento de los ratones de ambos genotipos es bastante homogéneo a lo largo del test. A modo de ejemplo, en la figura 18c, 18d y 18e se muestran curvas temporales para Sal, ANF 0,2 mg/kg y MTF 1,0mg/kg respectivamente.

En primer lugar se observó que el tratamiento con Sal no produce cambios en los niveles de actividad locomotora en función del tiempo, siendo ésta, como se observa en la Figura 18c, constante en ambos genotipos durante todo el periodo de evaluación. El ANOVA

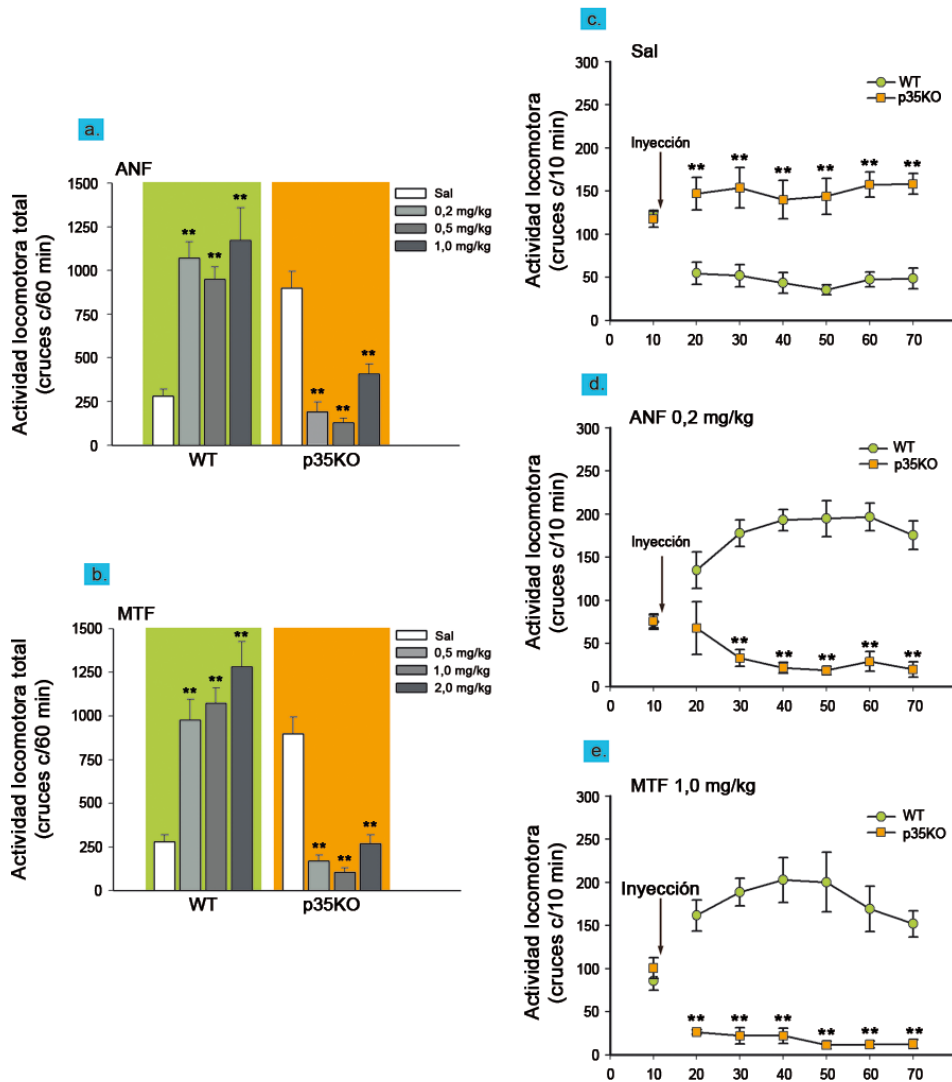


Figura 18: Efecto del tratamiento con psicoestimulantes en la actividad locomotora de ratones p35KO y WT.

a. y **b.** Actividad locomotora de ratones p35KO y WT, tratados con solución salina (Sal) o tres dosis de (a.) anfetamina (ANF, 0,2; 0,5 y 1,0 mg/kg) o (b.) o tres dosis de metilfenidato (MTF, 0,5; 1,0 y 2,0 mg/kg). Tanto el tratamiento con (a.) ANF o (b.) MTF produjeron un aumento significativo de la actividad locomotora en ratones WT, mientras que en ratones p35KO indujeron una marcada reducción de la actividad locomotora con respecto a los tratados con Sal. **c.** **d.** y **e.** Curva temporal de la actividad locomotora en ratones p35KO y WT tratados con (c.) Sal, (d) 0,2 mg/kg ANF y (e) 1,0 mg/kg MTF. Se observa que en ratones tratados con Sal, la actividad locomotora de los ratones p35KO es mayor a la de los ratones WT. **a.** y **b.** ANOVAs de dos vías (genotipo x tratamiento) seguido por el test a *posteriori* de Duncan **a.** Interacción $F(3,44)=25,381$ $p<0,001$, WT $n=24$, p35KO $n=28$, **b.** Interacción $F(3,38)=61,159$ $p<0,001$, WT $n=24$, p35KO $n=20$, **c.** **d.** y **e.** ANOVAs de una vía individuales en cada tiempo. **c.** $F(1,10)>14,975$, todos los $p<0,002$, WT $n=6$, p35KO $n=6$; **d.** todos los $F(1,11)>56,887$, todos los $p<0,001$, WT $n=7$, p35KO $n=6$; y **e.** $F(1,9)>35,667$, todos los $p<0,001$, WT $n=5$, p35KO $n=6$. Las barras de error representan el error estándar de la media. ** $p<0,01$.

de dos vías de medidas repetidas, indicó la presencia de un efecto del genotipo ($F(1,10)=36,204$ $p<0,001$), y la interacción entre genotipo y tiempo ($F(6,60)=5,5744$ $p<0,001$), pero no efecto del factor tiempo por si mismo. El análisis *a posteriori* de Duncan no indicó diferencias significativas en la actividad locomotora entre los diferentes tiempos post inyección en ninguno de los genotipos, sin embargo, ambos ratones presentaron diferencias en su actividad locomotora en todos los tiempos en comparación con la actividad locomotora previa al tratamiento con Sal. Por otro lado, ANOVAS de una vía (tratamiento) realizados en cada tiempo, señalaron que en todos los intervalos post inyección la actividad locomotora de los ratones p35KO es significativamente mayor a la de los WT (todos los $F(1,10)>14,975$, todos los $p<0,002$). Estos resultados encontrados en la actividad locomotora de ratones de ambos genotipos tratados con Sal se corresponde con lo que se observó previamente en ratones p35KO y WT que no recibieron ningún tratamiento (Figura 17b).

Por otro lado, en ratones tratados con 0,2 mg/kg de ANF, un ANOVA de dos vías de medidas repetidas (genotipo x tiempo) indicó la presencia de un efecto de genotipo ($F(1,11)=70,639$ $p<0,001$) y la interacción de éste con el factor tiempo ($F(6,66)=15,154$ $p<0,001$), mientras que el efecto del factor tiempo estuvo cerca de la significancia estadística ($p=0,075$). En ratones p35KO, el análisis *a posteriori* de Duncan señaló que el tratamiento con 0,2 mg/kg de ANF produce una disminución estadísticamente significativa de la actividad locomotora, observable 20 min después de la administración (tiempo 30 min) de dicho fármaco, la cual se mantuvo reducida durante todo el tiempo restante de la evaluación. Además, a partir de dicho tiempo (30 min), no se observaron diferencias entre éste y los tiempos restantes. Por otro lado, en ratones WT, la administración de 0,2 mg/kg de ANF produjo un aumento en la actividad locomotora, la cual fue estadísticamente significativa a partir de los 10 min post inyección y se mantuvo elevada en todos los periodos de tiempo restantes (test *a posteriori* de Duncan, todos los $p<0,022$). Finalmente, al comparar la actividad locomotora entre ratones p35KO y WT que recibieron 0,2 mg/kg de ANF, se observó que a partir de los 20 min post inyección la actividad locomotora de los ratones p35KO fue menor a la de los WT (ANOVAS de una vía, genotipo, todos los $F>56,870$, todos los $p<0,001$); mientras que a los 10 min post inyección la disminución de la actividad locomotora en los ratones p35KO con respecto a la de los WT estuvo cerca de ser estadísticamente significativa ($p=0,09$). Estos resultados indican que a esta dosis, ANF es efectiva para producir

aumentos en la actividad locomotora de ratones WT, observándose sus efectos rápidamente (a los 10 min post inyección) y además produce efectos paradójales en ratones p35KO, detectables a partir de los 20 min post- administración. Además, se observó en ambos genotipos que los efectos de estas se mantuvieron al menos durante los 60 min post inyección (Figura 18d).

Finalmente, cuando se analizó el efecto del tratamiento con 1,0 mg/kg de MTF a lo largo de 60 min en ratones de ambos genotipos, se encontró un patrón similar al presentado en los tratados con ANF (Figura 18e). Este efecto se analizó estadísticamente de la manera antes mencionada. Un ANOVA de dos vías (genotipo x tiempo), con el factor tiempo como medida repetida, indicó un efecto del genotipo ($F(1,9)=111,39$, $p<0,01$) y la interacción entre el genotipo y el tiempo ($F(6,54)=13,559$, $p<0,001$). En ratones p35KO, a través del test *a posteriori* de Duncan, se observó una rápida disminución de la actividad locomotora, estadísticamente significativa, a partir de los 10 min post-inyección; ésta se mantuvo disminuida durante el test en todos los tiempos siguientes (todos los $p<0,01$) en comparación a la actividad locomotora previa a la inyección de MTF. Además, el test *a posteriori* de Duncan no encontró diferencias significativas entre los distintos tiempos posteriores a la administración de MTF. En ratones WT, el patrón fue similar pero en el sentido inverso, a los 10 min post inyección, 0,1 mg/kg MTF produjo un aumento significativo de la actividad locomotora, la cual se mantuvo elevada durante todo el test con respecto a la actividad pre-inyección (Duncan, todos los $p<0,001$); además, ésta no presentó variaciones luego de los 10 min post-inyección. Por otro lado, cuando se comparó la actividad locomotora de los ratones p35KO y WT que recibieron 1,0 mg/kg de MTF, mediante ANOVAs de una vía (genotipo) en cada tiempo, se observó que la actividad locomotora de los ratones p35KO fue menor a la de los WT en todos los tiempos posteriores a la administración de dicho fármaco (todos los $F(1,9)>35,667$, todos los $p<0,001$) (Figura 18e). Estos datos indican que esta dosis de MTF es efectiva para producir hiperactividad en ratones WT y sedación en ratones p35KO y que esta produce sus efectos rápidamente, a partir de diez min, manteniéndose constante al menos durante los 60 min restantes de la evaluación.

1.3 Los ratones p35KO presentan menores niveles de ansiedad.

Es frecuente que animales con comportamientos similares a TDAH, exhiban menores niveles de ansiedad y/o de inhibición comportamental (Mormede y col., 2002). Debido a esto, evaluamos a los ratones p35KO y WT en el LCE, el cual crea un conflicto entre la exploración y la exposición a áreas expuestas que representan un peligro potencial. El análisis estadístico (ANOVA de una vía) señaló la presencia de un efecto de genotipo tanto para el número de entradas a los brazos abiertos ($F(1,10)=45,79$, $p<0,001$; p35KO n=5, WT n=7) como para el tiempo de permanencia en estos ($F(1,10)=53,67$, $p<0,001$; p35KO n=5, WT n=7), pero no así para el número total de entradas a ambos brazos. Como se observa en la Figura 19a y 19b, los ratones WT presentaron una alta evasión a los brazos abiertos del LCE, evidenciado por el bajo número de entradas y tiempo de permanencia en estos; en contraste, los ratones p35 KO entraron más frecuentemente (Figura 19a) y pasaron más tiempo en los brazos abiertos (Figura 19b) en comparación a los ratones WT, indicando una falta de preferencia tanto por los brazos abiertos o cerrados del laberinto en cruz. Finalmente, el número de entradas totales a ambos brazos del LCE no difirió entre los genotipos (Figura 19c), indicando que la motivación por explorar es similar en ambos

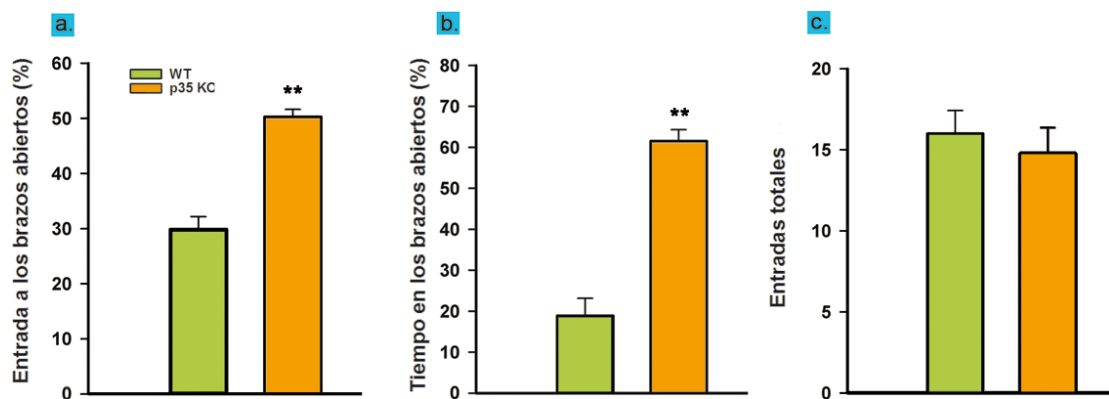


Figura 19: Comportamiento de los ratones p35KO y WT en el laberinto en cruz elevado (LCE). **a.** Número de entradas a los brazos abiertos, expresado como porcentaje del total de entradas. **b.** Tiempo de permanencia en los brazos abiertos expresado como porcentaje del tiempo total de evaluación. **c.** Número de entradas a ambos brazos del LCE. Se observa (a.) un mayor número de entradas (ANOVA de una vía, $F(1,10)=45,79$, $p<0,001$; p35KO) y (b.) tiempo de permanencia ($F(1,10)=53,67$, $p<0,001$) en los brazos abierto en ratones p35KO con respecto a los WT. No se observan diferencias en el número total de entradas (c.). ** $p<0,01$. Las barras de error representan el error estándar de la media. p35KO n=5, WT n=7.

genotipos y que las diferencias encontradas en este test no se deberían a la hiperactividad locomotora de los ratones p35KO.

SECCIÓN 2: CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA NEUROTRANSMISIÓN DOPAMINÉRGICA DEL RATON p35KO

Gran cantidad de evidencias indican que CDK5 es un importante regulador de la neurotransmisión dopaminérgica (Bibb y *col.*, 1999; Chergui y *col.*, 2004; Moy y Tsai, 2004), además, la DA ha sido altamente relacionada con la patofisiología del TDAH (Sagvolden y *col.*, 2005a). Por lo tanto, decidimos estudiar en este modelo de ratón transgénico el metabolismo de DA, poniendo énfasis en su síntesis y productos metabólicos.

2.1 Los ratones juveniles deficientes en p35 presentan elevados niveles de la enzima tirosina hidroxilasa y mayor síntesis de DA

CDK5 es un importante regulador de la enzima TH (Kansy y *col.*, 2004; Moy y Tsai, 2004), paso limitante en la síntesis de catecolaminas. La TH en neuronas dopaminérgicas del VTA y SNc, cataliza la conversión de L-tirosina a L-DOPA, la cual es luego rápidamente convertida a DA por medio de la enzima AADC.

Como se observa en la Figura 20a, las preparaciones inmunohistoquímicas de cortes coronales al nivel del Str y NAc marcadas con un anticuerpo específico contra TH presentaron un nivel de inmunoreactividad mayor en los ratones juveniles p35KO comparados con los WT. Estas observaciones fueron confirmadas mediante análisis de western blot de preparaciones provenientes de extractos de Str y NAc (Figura 20b) de ratones p35KO y WT de 24 días de edad, en los cuales se encontró un aumento estadísticamente significativo en las dos áreas analizadas provenientes de ratones p35KO en comparación a los animales WT (ANOVA de una vía, Str: $F(1,20)=20,519$, $p<0,001$, $n=22$, NAc: $F(1,12)=6,797$, $p=0,023$, $n=14$). Los niveles de TH fueron aproximadamente dos veces mayores en ratones p35KO con respecto a los WT.

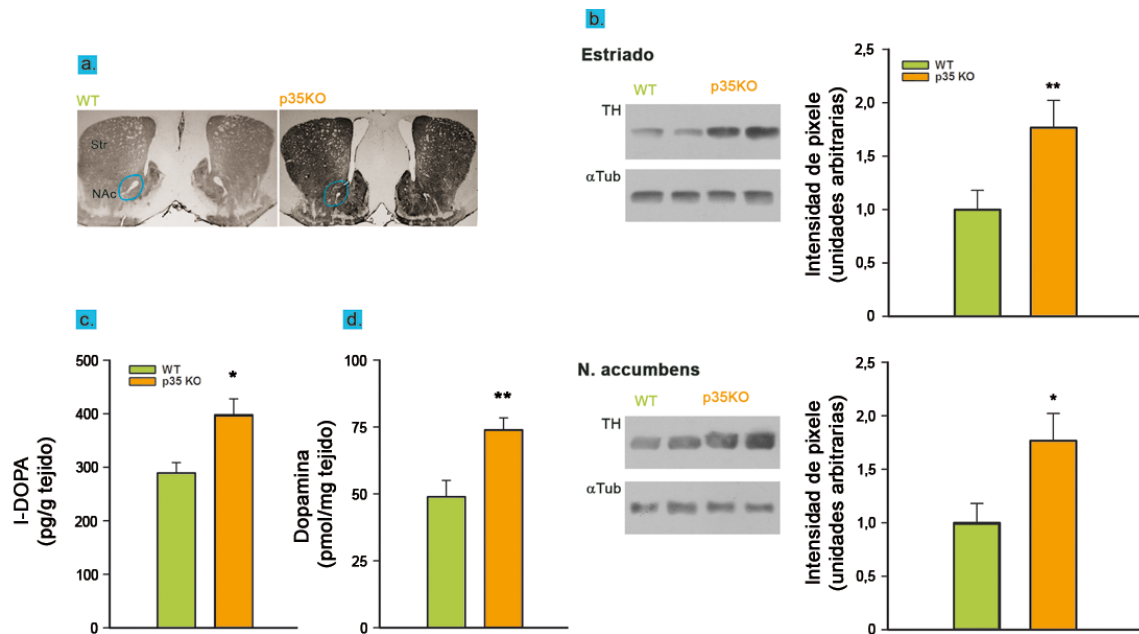


Figura 20: Niveles de tirosina hidroxilasa (TH) y de síntesis de DA en ratones p35KO y WT juveniles. a. Tinción inmunohistoquímica de TH en cortes coronales de cerebro de ratones p35KO y WT al nivel del estriado (Str) y Nucleus accumbens (Nac). Se observa una mayor inmunoreactividad en ratones p35KO. (b.) Análisis de western blot mostrando niveles de expresión de TH en Str y NAc de ratones p35KO y WT. ANOVAS de una vía indican niveles significativamente mayores de TH en ratones p35KO en ambas áreas, (Str: $F(1,20)=20,519$, $p<0,001$, $n=22$, NAc: $F(1,12)=6,797$, $p=0,023$, $n=14$). Las barras representan la medida densitométrica de los western blot expresadas en unidades arbitrarias comparadas con los niveles de los ratones WT. c. Niveles de acumulación de I-DOPA en Str de ratones p35KO y WT tratados 30 min antes con el inhibidor NSD1015. Se observa que ratones p35KO acumulan mayor cantidad de I-DOPA, (ANOVA de una vía $F(1,17)=6,679$, $p=0,019$, WT $n=7$, p35KO $n=12$). d. Niveles totales de DA en Str de ratones p35KO y WT. Se observa que ratones p35KO contienen mayores niveles de DA que los ratones WT ($F(1,11)=10,139$, $p=0,009$, p35KO $n=6$, WT $n=7$). En c. y d. las barras representan la media de la determinación de I-DOPA y DA respectivamente medida mediante cromatografía líquida de alta presión. Las barras de error representan el error estándar de la media. * $p<0,01$; ** $p<0,001$.

A continuación se evaluaron los niveles de síntesis de DA en ratones de ambos genotipos. Para esto, determinamos los niveles de acumulación de I-DOPA en ratones pre tratados con el inhibidor de la enzima AADC, NSD1015, el cual bloquea la conversión de I-DOPA a DA (Carlsson y col., 1977). Teniendo en cuenta que I-DOPA no es liberada en las sinapsis ni es susceptible de ser degradada por MAO o por COMT, los niveles de este metabolito pueden ser utilizados como una medida indirecta de la actividad de TH.

Mediante HPLC acoplada a detección electroquímica se determinó que los ratones p35KO acumulan más L-DOPA que los ratones WT en Str (ANOVA de una vía $F(1,17)=6,679$, $p=0,019$, WT $n=7$, p35KO $n=12$) (Figura 20c) luego de ser tratados con NSD1015. Además, no se encontraron niveles detectables de DA en estos animales (no graficado), corroborando que a la dosis usada, el inhibidor bloquea completamente la conversión de L-DOPA a DA.

Complementario a este experimento, se determinaron mediante la misma técnica los niveles totales de DA en muestras de Str provenientes de ratones p35KO y WT (Figura 20d). Los resultados obtenidos, muestran que los ratones deficientes en p35 presentan mayores niveles de DA en comparación con los WT, en los cuales un ANOVA de una vía indicó diferencias significativas entre ambos genotipos ($F(1,11)=10,139$, $p=0,009$, p35KO $n=6$, WT $n=7$).

2.2 Los niveles de TH, la síntesis y el metabolismo de DA son normales en ratones p35KO adultos.

Considerando que altos niveles de actividad locomotora pueden relacionarse con niveles elevados de DA en modelos animales de TDAH (Russell y col., 2005) y que en ratones p35KO el fenotipo hiperactivo desaparece a edades adultas (Figura 17a), decidimos analizar los niveles de expresión de la enzima TH y los niveles de DA en Str de ratones p35KO y WT adultos. A diferencia de lo observado en ratones juveniles, los niveles de TH ($n=25$) y DA total ($n=16$), encontrados en Str de ratones p35KO adultos fueron indistinguibles a los de los ratones WT (Figura 21a y 21b). Complementario a esto, medimos los niveles de DOPAC, un metabolito primario proveniente de la degradación de DA, cuya concentración puede utilizarse como una medida de la utilización de DA. Los niveles de DOPAC y el cociente entre DOPAC/DA no difirió entre ratones de ambos genotipos ($n=16$) (Figura 21c y 21d).

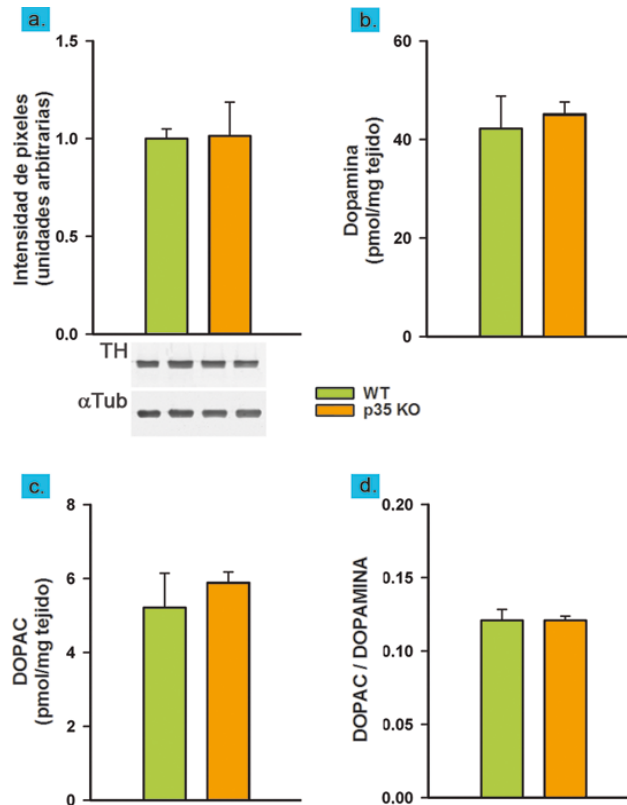


Figura 21: Niveles de expresión de tirosina hidroxilasa (TH) y niveles de DA, ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) y tasa de utilización de DA (DOPAC/DA) en ratones p35KO y WT adultos. a. Inmunoblot revelado contra TH de Str de ratones p35KO y WT y la cuantificación densitométrica de estos, estandarizada contra α -tubulina. Se observa que ratones p35KO y WT adultos expresan niveles indistinguibles de TH. b. y c. Niveles de DA y de su metabolito DOPAC, provenientes de Str de ratones p35KO y WT medidos mediante cromatografía líquida de alta presión. d. Cociente entre DOPAC/DA, indicando la tasa de utilización de DA por ratones p35KO y WT adultos. No se observan diferencias en los niveles de DA, DOPAC y DOPAC/DA entre ratones de ambos genotipos. Las barras de error representan el error estándar de la media.

SECCIÓN 3: METABOLISMO DE DOPAMINA EN RATONES p35KO JUVENILES

Teniendo en cuenta que los ratones p35 KO juveniles presentan alteraciones en la síntesis de DA, analizamos los niveles del metabolito DOPAC. Este metabolito es principalmente producido a partir de la DA que es recaptada y que no puede ser transportada rápidamente hacia el interior de las vesículas sinápticas (Gesi y col., 2001; Best y col., 2009), por lo que su producción puede interpretarse como una medida de la

utilización de DA. Además, evaluamos si la administración de psicoestimulantes produce alteraciones en niveles totales de DA y en la producción de DOPAC. Finalmente se analizaron los posibles efectos de la administración de ANF y MTF en los niveles de expresión de la enzima TH.

3.1. La administración de ANF y MTF normaliza los niveles de DA y DOPAC en los ratones

p35KO.

Con el fin de analizar los niveles de DA y DOPAC en Str de de los ratones p35KO y WT, en respuesta al uso de psicoestimulantes, ratones de ambos genotipos, de 24 días edad, fueron tratados con 0,5 mg/kg de ANF, 0,5 mg/kg de MTF, o con SAL y sacrificados 30 min después de la administración.

Como se observa en la Figura 22a, la administración de 0,5 mg/kg de ANF o 0,5 mg/kg de MTF, produjeron una marcada disminución de los niveles totales de DA en ratones p35KO con respecto a los que recibieron Sal; sin embargo ambos fármacos no afectaron los niveles totales de DA en ratones WT, siendo este, indistinguible del de los ratones tratados con Sal. Esto fue analizado mediante ANOVA de dos vías (genotipo x tratamiento) en el cual no se observó un efecto del genotipo ($F(1,21)=1,134$) pero sí del tratamiento ($F(2,21)=4,567$, $p=0,023$) y de la interacción entre ambos factores ($F(2,21)=4,281$ $p=0,028$, p35KO n=13, WT n=15). El análisis *a posteriori* de Duncan indicó la presencia de diferencias significativas entre ratones p35KO que recibieron ANF ($p=0,031$) o MTF ($p<0,001$) con respecto a los que fueron tratados con Sal. De manera interesante, los niveles de DA de ratones p35KO tratados con ANF o MTF no difirió del de los ratones WT que recibieron el mismo tratamiento.

A continuación, se analizaron los niveles de DOPAC en ratones p35KO y WT tratados con Sal, o con psicoestimulantes (Figura 22b). Estos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías (genotipo x tratamiento), en el cual se observó un efecto del genotipo ($F(1,21)=9,665$ $p=0,005$) y del tratamiento ($F(2,21)=4,7312$, $p=0,020$), pero no de la interacción entre ambos ($F(2,21)=1,276$, $p=0,294$) (p35KO n=13, WT n=17).

Al comparar los niveles basales de DOPAC en ratones tratados con Sal, se observó que los ratones p35KO presentan un nivel de DOPAC significativamente menor que los

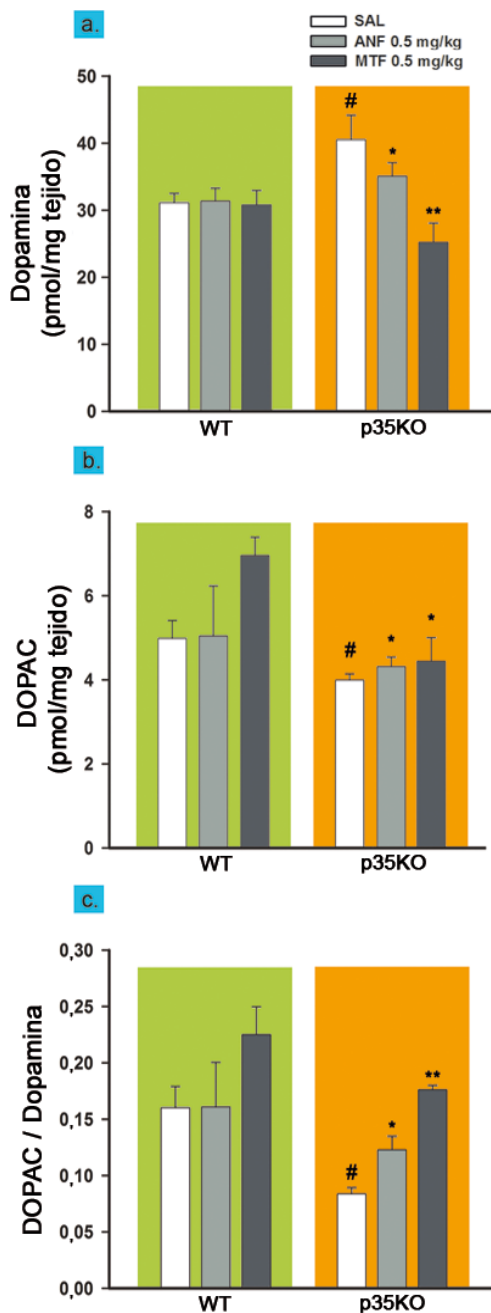


Figura 22: Efectos de la administración de ANF y MTF en los niveles de DA, DOPAC y en la utilización de DA (DOPAC/DA), en ratones p35KO y WT juveniles. **a.** Niveles de DA en ratones p35KO y WT tratados con solución Sal, con 0,5 mg/kg ANF o con 0,5 mg/kg MTF. El tratamiento tanto con ANF o MTF produce una disminución en los niveles de DA de ratones p35KO con respecto a los tratados con Sal. No se observaron diferencias entre los ratones p35KO y WT que recibieron el mismo tratamiento. ANOVA de dos vías, interacción genotipo x tratamiento $F(2,21)=4,281$ $p=0,028$, p35KO n=13, WT n=15), seguido por test a posteriori de Duncan. **b.** Niveles de DOPAC en ratones p35KO y WT tratados con Sal, con ANF o MTF. Se observa que ratones p35KO tratados con Sal presentan menores niveles de DOPAC (ANOVA de una vía ($F(1,8)=5,466$, $p=0,048$, p35KO). El tratamiento con ANF o MTF produce un aumento en los niveles de DOPAC en ratones p35KO con respecto a los tratados con Sal (ANOVA de una vía, $F(2,10)=5,1598$, $p=0,029$, Sal n=7, ANF n=3, MTF n=3, seguido por test a posteriori de Duncan). **c.** Tasa de recambio de DA (DOPAC/DA). La tasa DOPAC/DA es menor en ratones p35KO tratados con Sal con respecto a los WT con igual (ANOVA de una $F(1,8)=15,458$, $p=0,043$). El tratamiento con ANF o MTF produjo un aumento de DOPAC/DA en ratones p35KO con respecto a los tratados con Sal (ANOVA de una vía $F(2,10)=24,085$, $p=0,043$, y test de Duncan). * Indican comparaciones entre los ratones p35KO tratados con ANF o MTF con respecto a los que recibieron Sal. # Indica diferencias entre ratones p35KO y WT tratados con sal. #,* $p<0,05$; ** $p<0,01$.

ratones WT, como fue demostrado mediante un ANOVA de una vía ($F(1,8)=5,466$, $p=0,048$, p35KO n=7, WT n=3).

En ratones WT, el tratamiento con psicoestimulantes no produjo diferencias significativas en los niveles de DOPAC con respecto a los ratones que recibieron Sal, aunque el tratamiento con 0,5 mg/kg MTF (n=5) produjo una tendencia a un aumento en los niveles de DOPAC en comparación con los tratados con ANF (n=7) o Sal (n=3). Un ANOVA de una vía

(tratamiento), indicó la falta de diferencias significativas, aunque esta estuvo cerca de la significancia estadística ($p=0,064$,) (Figura 22b).

Por otro lado, en ratones p35KO se observó que el tratamiento con ANF o MTF produjo un aumento en los niveles de DOPAC con respecto a los tratados con Sal. Un ANOVA de una vía, demostró un efecto del tratamiento con psicoestimulantes en ratones p35KO ($F(2,10)=5,1598$, $p=0,029$, Sal $n=7$, ANF $n=3$, MTF $n=3$); y el test *a posteriori* de Duncan indicó diferencias significativas entre los ratones tratados con ANF y MTF con respecto a los tratados con Sal (ANF vs Sal: $p=0,047$; MTF vs Sal, $p=0,033$). No se observaron diferencias en los niveles de DOPAC entre ratones tratados con ANF y MTF (Figura 22b).

Con respecto a la tasa de recambio de DA, es decir el cociente entre DA y DOPAC (DOPAC/DA), un ANOVA de dos vías mostró un efecto de genotipo ($F(1,21)=7,950$, $p=0,010$) y del tratamiento ($F(2,21)=7,619$, $p=0,003$), pero no la interacción entre ambos factores (Figura 22c).

Un ANOVA de una vía ($F(1,8)=15,458$, $p=0,043$) demostró que ratones p35KO tratados con Sal, tienen una tasa DOPAC/DA menor que los WT que recibieron el mismo tratamiento, es decir, presentan una menor tasa de utilización de DA.

En ratones p35KO el tratamiento con ANF o MTF, produjo un aumento significativo de la tasa DOPAC/DA en comparación con los ratones tratados con Sal, como lo demostró una ANOVA de una vía (tratamiento, $F(2,10)= 24,085$, $p=0,043$) y el correspondiente análisis *a posteriori* de Duncan (Sal Vs ANF $p=0,047$; Sal vs. MTF $p<0.001$). Esto indica, que el tratamiento con psicoestimulantes, en los ratones p35KO produce una normalización en la tasa metabólica de DA (Figura 22c).

Por otro lado, en ratones WT, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de DOPAC/DA entre los ratones que fueron tratados con ANF, MTF o Sal.

3.2 El tratamiento con ANF o MTF produce una disminución de los niveles de TH en ratones p35KO.

Teniendo en cuenta que el tratamiento con psicoestimulantes produjo una disminución en la concentración de DA, evaluamos los niveles de TH mediante western blot en Str de ratones p35KO y WT, 30 min después de haber sido administrados con Sal, o con

0,5 mg/kg de ANF o con 0,5 mg/kg de MTF. En este experimento se utilizaron 29 ratones WT (12 sal, 10 ANF, 7 MTF) y 27 p35 KO (11 sal, 7 ANF, 9 MTF).

El análisis de western blot indicó un disminución estadísticamente significativa en los niveles de expresión de TH en ratones p35KO tratados tanto con ANF o MTF, con respecto a los tratados con Sal. Por otro lado, el mismo tratamiento farmacológico no produjo modificaciones en los niveles de TH en ratones WT (Figura 23). Este resultado se demostró mediante un ANOVA de dos vías (genotipo x tratamiento) el cual detectó la presencia de la interacción entre el genotipo y el tratamiento ($F(2,50)=4,945$, $p=0,011$). El análisis *a posteriori* de Duncan indicó la presencia de diferencias significativas en ratones p35KO tratados con ANF ($p=0,015$) y MTF ($p=0,0156$) con respecto a los que recibieron Sal.

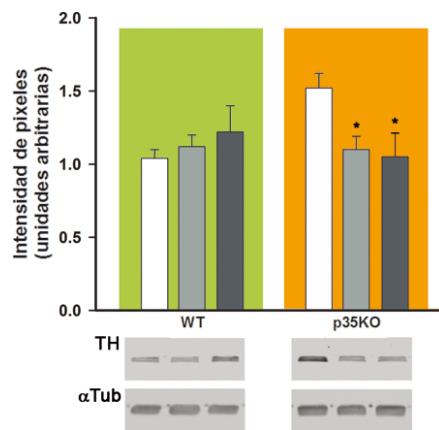


Figura 23: La administración de psicoestimulantes restablece los niveles de TH en ratones p35KO. Niveles de expresión de TH en ratones p35KO tratados con Sal, 0,5 mg/kg de ANF o 0,5 mg/kg de MTF. Inmunoblot revelado con anticuerpo anti-TH y la correspondiente medición densitométrica estandarizada contra α -tubulina. Un ANOVA de dos vías (interacción genotipo por tratamiento, $F(2,50)=4,945$, $p=0,011$) seguido por el test *a posteriori* de Duncan señaló que el tratamiento con ANF y MTF produce una disminución en los niveles de TH en ratones p35KO con respecto a los tratados con Sal. WT: sal n=12, ANF n=10, 7 MTF n=7; p35 KO: sal n=11, ANF n=7, MTF n=9. Los valores se expresan en unidades arbitrarias referidas al valor de los ratones WT tratados con Sal. Las barras de error indican el error estándar de la media. * $p<0,05$

SECCIÓN 4: PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES D1 y D2 EN LA HIPERACTIVIDAD DEL RATON p35KO.

4.1 Función de los receptores de DA D1 en el establecimiento del fenotipo hiperactivo de los ratones p35KO

4.1.1 La función del receptor D1 es necesaria para la expresión de la hiperactividad locomotora de ratones p35KO.

Altos niveles de actividad locomotora se han relacionado con una sobreactivación de receptores de DA D1 (Arnt y *col.*, 1988; Bordi y Meller, 1989). Con el fin de evaluar el posible rol del receptor D1 en la hiperactividad observada en ratones p35KO, animales de ambos genotipos y de 24 días de edad, fueron tratados con el inhibidor de D1, SCH23390, y su actividad locomotora se analizó en el paradigma del campo abierto durante 60 min. Para este experimento se utilizaron 12 ratones p35KO (6 Sal, 6 SCH23390) y 19 WT (12 Sal, 7 SCH23390).

Tanto en animales p35KO como WT, la administración de 0,05 mg/kg de SCH23390 produjo una disminución estadísticamente significativa en la actividad locomotora con respecto a los animales a los que se les administró Sal (Figura 24a). El análisis estadístico de este resultado se realizó mediante un ANOVA de dos vías (tratamiento x genotipo), en el cual se detectó un efecto del genotipo ($F(1,27)=88,119$ $p<0,001$), del tratamiento ($F(1,27)=95,620$ $p<0.001$) y de la interacción entre ambos factores ($F(1,27)=34,027$ $p<0,001$). Las diferencias entre animales que recibieron los distintos tratamientos se detectó a través del test *a posteriori* de Duncan (WT Sal vs WT SCH $p=0,013$, p35KO Sal vs p35KO SCH $p< 0,001$). Además, el análisis *a posteriori* indicó que la actividad locomotora de los ratones p35KO tratados con SCH23390 fue mayor a la de los ratones WT con el mismo tratamiento ($p=0.018$). Este resultado indicaría que, al menos en parte, la hiperactividad locomotora en ratones p35KO estaría mediada por la actividad del receptor D1.

Por otro lado se observó que el efecto producido por el uso del SCH23390, fue mayor en los ratones p35KO, en los cuales la administración de esta droga produjo una disminución de aproximadamente 3,2 veces en la actividad locomotora, mientras que el mismo tratamiento produjo una disminución de solo 2 veces en los ratones WT. De manera

interesante, la inhibición farmacológica de los receptores D1 en los ratones p35KO produjo que la actividad locomotora de éstos disminuyera a valores casi idénticos al de los ratones WT tratados con Sal. Este resultado se comprobó estadísticamente mediante una comparación planeada realizada sobre el ANOVA anterior, en la cual se contrastaron los niveles de actividad locomotora entre ratones p35KO tratados con SCH23390 y ratones WT tratados con Sal. Este análisis no mostró diferencias significativas, indicando que la actividad locomotora de los ratones p35KO tratados con SCH23390 no difirió de la de los ratones WT tratados con Sal.

Con el fin de estudiar el efecto de la inhibición de los receptores D1 en la actividad locomotora de ratones de ambos genotipos, esta se evaluó cada 10 min a lo largo de los 60 min totales que duró el test (Figura 24b).

Para este análisis se utilizaron dos test estadísticos independientes. En primer lugar se realizó un ANOVA de tres vías (genotipo x tratamiento x tiempo) de medidas repetidas (tiempo) en el cual se analizó la totalidad de los datos y se utilizó para analizar los cambios en la actividad locomotora en función del tiempo. En segundo lugar, para estudiar las diferencias producidas por la administración del SCH23390 entre genotipos y tratamientos se realizó un ANOVA individual (dos vías, genotipo x tratamiento) para cada intervalo de tiempo.

El análisis de las curvas temporales indica que el efecto del SCH23390 en la actividad locomotora de ratones de ambos genotipos varía en función del tiempo a lo largo de los 60 min que duró el test. El ANOVA de tres vías demostró la existencia del efecto del genotipo ($F(1,27)=92,525$, $p<0,001$), del tratamiento ($F(1,27)=99,279$, $p<0,001$), del tiempo ($F(5,135)=41,102$, $p<0,01$) y la triple interacción entre éstos ($F(5,135)=6,739$, $p<0,001$).

En ratones p35KO tratados con SCH23390 el análisis de la curva temporal mediante el test *a posteriori* de Duncan indicó que la actividad locomotora de estos es estadísticamente significativa entre los 10 min iniciales y todos los tiempo subsiguientes (todos los $p<0,01$); además, se observó que a partir de los 30 min la actividad locomotora ya no presenta diferencias con los tiempos siguientes, y que a partir de dicho tiempo la actividad locomotora alcanza sus valores mínimos.

Con respecto a la actividad locomotora de los ratones p35KO tratados con SCH23390 comparados con los que recibieron Sal, se observó que el efecto de dicha droga es muy rápido, ya que a los 10 min de la administración de ésta, la actividad locomotora de

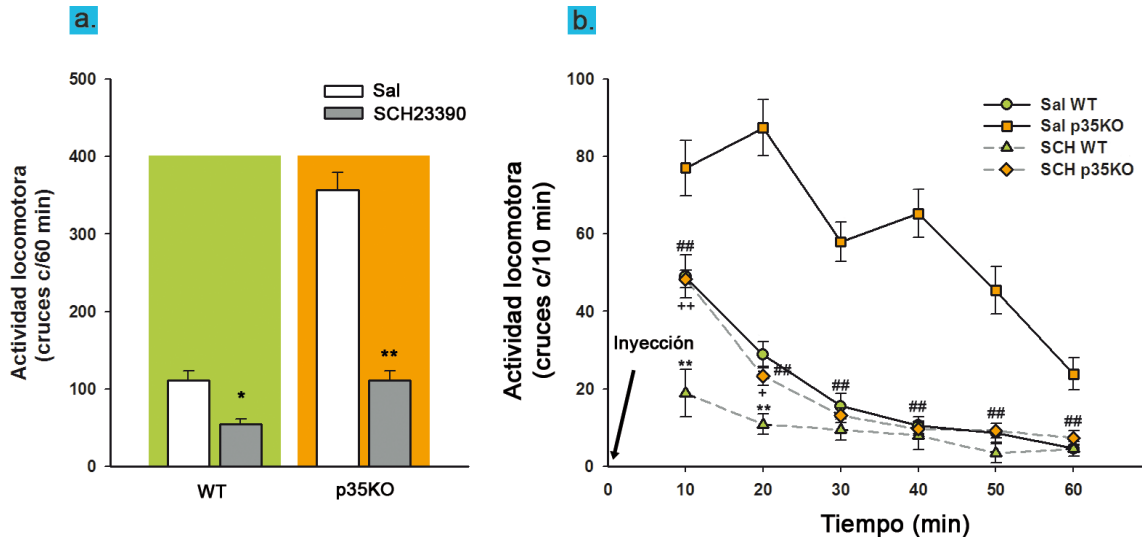


Figura 24: Efecto de la inhibición de los receptores D1 en la actividad locomotora de ratones p35KO y WT. a.

Actividad locomotora de ratones p35KO y WT tratados con Sal o con 0,05mg/kg del inhibidor de D1 SCH23390. Las barras indican la media de la actividad locomotora de los ratones durante 60 min. Se observa que dicho antagonista produce una disminución en la actividad locomotora de ratones de ambos genotipos con respecto a los tratados con Sal (ANOVA de dos vías, interacción $F(1,27)=34,027$, seguido de test *a posteriori* de Duncan). **b.** Curva temporal del efecto de la actividad locomotora de ratones p35KO y WT tratados con SCH23390. Cada punto representa la actividad locomotora cada 10 min. Se observa que el tratamiento con dicho inhibidor produce una disminución de la locomoción en ratones de ambos genotipos comparados a los que recibieron sal. ANOVAS individuales en cada tiempo. En b. # Indica diferencias entre ratones Sal p35KO vs. SCH p35KO (todos los $F(1,11)>10,023$ todos los $p<0,01$), * entre Sal WT y SCH WT (10 min $F(1,16)=11,412$ $p=0,004$; 20 min $F(1,16)=11,328$ $p=0,003$) y + entre SCH WT y SCH p35KO (10 min $F(1,10)=17799$, $p=0,002$; 20 min $F(1,10)=7,785$ $p=0,019$). WT: Sal n=12, SCH n=6; p35KO: Sal n=7; SCH n=6. Las barras de error representan el error estándar de la media. *, #, + $p<0,05$; **, ##, ++ $p<0,01$

los ratones p35KO tratados con dicha droga es menor que la observada en ratones del mismo genotipo tratados con Sal. Este resultado se analizó mediante una ANOVA de una vía (tratamiento) realizado para la actividad locomotora en dicho tiempo (10 min), este reveló un efecto del tratamiento ($F(1,11)=11,822$ $p<0,001$), indicando la existencia de diferencias significativas en ratones p35KO que recibieron SCH23390 o Sal. ANOVAs en los restantes intervalos de tiempo (20-60min) indicaron una disminución significativa en la actividad locomotora de ratones p35KO inducida por SCH23390 con respecto a los animales tratados con Sal (todos los $F(1,11)>10,023$ y todos los $p<0,01$).

En los ratones WT tratados con SCH23390, el análisis *a posteriori* sobre la curva temporal de la actividad locomotora, señaló que ésta fue significativamente menor entre los dos últimos tiempos (50-60 min) comparados con los 10 min iniciales; sin embargo, la comparación entre todos los tiempos subsiguientes no mostró diferencias significativas entre ellos.

Con respecto al efecto del SCH23390 en ratones WT en relación a los tratados con Sal, se observó una marcada disminución de la actividad locomotora a los 10 min post-inyección en los animales que recibieron el inhibidor de D1 con respecto a los controles; indicando que a este tiempo el SCH23390 ya comenzó a ejercer sus efectos. Un ANOVA de una vía (tratamiento) indicó la presencia de diferencias significativas en este tiempo ($F(1,16)=11,412$ $p=0,004$). Por otro lado, ANOVAs realizados en los tiempos subsiguientes solo demostraron una disminución en la actividad locomotora de ratones WT tratados con SCH23390 con respecto a los que recibieron Sal a los 20 min ($F(1,16)=11,328$ $p=0,003$) pero no se encontraron diferencias en los tiempos siguientes.

Finalmente, al comparar el efecto del SCH23390 en ratones p35KO con respecto a los WT, se observó que la actividad difirió significativamente sólo en los tiempos 10 y 20 min ($F(1,10)=17,799$ $p=0,002$; $F(1,10)=7,785$ $p=0,019$ respectivamente), en los cuales la actividad en los ratones transgénicos fue mayor que en los animales WT y que a partir del tiempo 30 min la actividad de ambos fue indistinguible.

4.1.2 La funcionalidad del receptor D1 no se encontraría alterada en el ratón p35KO.

Se ha demostrado que el uso de agonistas del receptor D1, tanto directos como indirectos producen aumentos en la actividad locomotora de ratas y ratones (Bordi y Meller, 1989). Además un grupo de investigadores demostró recientemente que, en un ratón hiperactivo genéticamente modificado que expresa una variante de DAT hipofuncional, la administración tanto de psicoestimulantes como del agonista de D1 SKF81297 produce una atenuación de la actividad locomotora (Napolitano y *col.*, 2010).

Con el fin de evaluar la participación del receptor D1 en el fenotipo hiperlocomotor encontrado en ratones p35KO y que este pueda estar relacionado con los efectos sedativos producidos por la administración de psicoestimulantes, se administró a ratones p35KO y WT

con una dosis de 5,0 mg/kg del agonista específico de D1 SKF81297 y se evaluó la actividad locomotora durante 60 min en el campo abierto. Se utilizaron para este fin se utilizaron en total 33 animales, 19 WT (12 Sal, 6 SKF81297) y 12 p35KO (6 Sal, 6 SKF81297)

Como se observa en la Figura 25 el tratamiento con SKF81297 produce un aumento significativo de la actividad locomotora total, tanto de ratones p35KO como WT, con respecto a los que fueron tratados con Sal. Además se encontró que la actividad locomotora de los ratones p35KO tratados con SKF81297 fue mayor que la de los ratones WT que recibieron el mismo tratamiento. Estos datos se analizaron y fueron confirmados mediante un ANOVA de dos vías (tratamiento x genotipo), el cual, indicó la presencia de un efecto del tratamiento ($F(1, 26)=74,406$, $p<0,001$), del genotipo ($F(1,26)=39,955$, $p<0,001$) y de la interacción entre ambos factores ($F(1,26)=10,42$, $p=0,033$). El test *a posteriori* de Duncan señaló diferencias significativas entre los ratones p35KO que recibieron SKF81297 y Sal ($p<0,01$), entre ratones WT tratados con SKF81297 y Sal ($p<0,01$) y entre ratones de ambos genotipos tratados con el inhibidor de D1 ($p<0,039$).

Por otro lado, se observó que la estimulación en la actividad locomotora producida por la administración de SKF81297 fue menor en los ratones p35KO, donde éste produjo un aumento de aproximadamente 1,4 veces con respecto a los que recibieron Sal, mientras que en los ratones WT esta estimulación fue cercana a 3,75 veces.

El análisis estadístico de los efectos del SKF81297 a lo largo de los 60 min de duración del test se realizó de la misma forma que la utilizada en el apartado anterior para el estudio temporal de la acción del antagonista SCH23390. En primer lugar se realizó un ANOVA de tres vías (genotipo x tratamiento x tiempo) con el factor tiempo como medida repetida. Este confirmó los efectos del genotipo ($F(1,26)=40,765$ $p<0,001$, del tratamiento ($F(1,26)=75,81$ $p<0,001$) y del tiempo ($F(5,130)=20,904$, $p<0,001$), además de la interacción entre los tres factores ($F(5,130)=3,7949$, $p=0,003$) (Figura 25b).

En ratones p35KO, SKF81297 produce un aumento gradual de los niveles de actividad locomotora con respecto a los 10 min iniciales. El análisis *a posteriori* de Duncan, indicó que la actividad locomotora de los ratones p35KO bajo este tratamiento alcanza niveles significativamente diferentes al tiempo 40 min comparado con los 10 min iniciales ($p=0,015$). Además, a los min 30 y 50 la actividad locomotora de estos ratones presenta niveles cercanos a la significancia estadística ($p=0,075$ y $p=0,068$ respectivamente) con

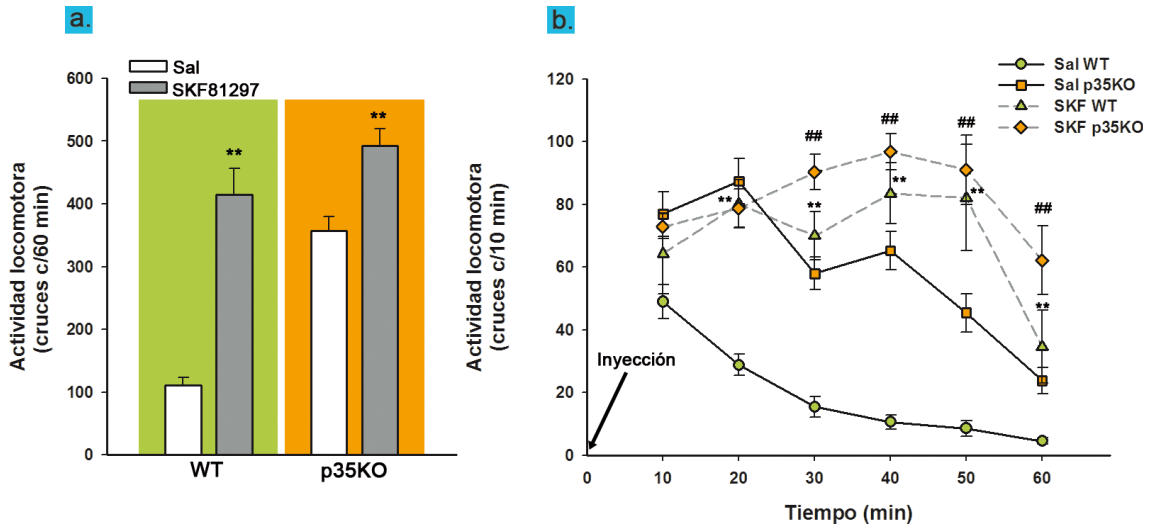


Figura 25: Efectos de la activación farmacológica de los receptores D1 en la actividad locomotora de ratones p35KO y WT. **a.** Actividad locomotora de ratones p35KO y WT tratados con Sal o con 5,0 mg/kg del activador de D1 SKF81297. Las barras indican la media de la actividad locomotora de los ratones durante 60 min. Se observa que dicho agonista produce un aumento en la actividad locomotora de ratones de ambos genotipos con respecto a los tratados con Sal, como lo indicó un ANOVA de dos vías y el test de Duncan (Interacción genotipo x tratamiento, $F(1,26)=10,42$, $p=0,033$). **b.** Curva temporal del efecto de la actividad locomotora de ratones p35KO y WT tratados con SKF81297. Cada punto representa la actividad locomotora cada 10 min. Se observa que el tratamiento con dicho activador produce una aumento en la locomoción de ratones de ambos genotipos observable durante todo el test. ANOVAS individuales en cada tiempo. En b. # Indica diferencias entre ratones Sal p35KO vs. SKF p35KO (todos los $F(1,10)>12,642$ todos los $p<0,005$), y * entre Sal WT y SKF WT (todos los $F(1,10)>13,889$, todos los $p<0,018$). WT: Sal $n=12$, SKF $n=6$; p35KO: Sal $n=7$; SKF $n=5$. Las barras de error representan el error estándar de la media. *, # $p<0,05$; **, ## $p<0,01$.

respecto a los 10 min iniciales. A partir del tiempo 40 min, donde la actividad locomotora presenta su nivel máximo, ésta empieza a mostrar una tendencia negativa, siendo significativamente diferente al tiempo final (60 min) ($p=0,004$). Por otro lado, se observó que la actividad locomotora de los ratones p35KO al min 60 fue indistinguible de la observada a los 10 min de iniciado el test, sin embargo, ésta fue significativamente menor que a los 30-50 min ($p=0,004$, $p<0,001$ y $p<0,001$ respectivamente), lo cual podría indicar que la duración del efecto de dicha dosis de SKF81297 sería cercana a 60 min (Figura 25b).

Con respecto al efecto en ratones p35KO tratados con SKF81297 en comparación a los que recibieron Sal, se observó mediante ANOVAs de una vía (tratamiento) realizados en

cada tiempo, que la administración de dicho agonista produce un aumento de la actividad locomotora a partir de los 30 min post inyección y ésta se mantiene elevada durante el resto del test con respecto a la actividad de los ratones p35KO que recibieron Sal (30 min. $F(1,10)=17,341$, $p<0,001$; 40 min. $F(1,10)=12,642$ $p=0,005$; 50 min. $F(1,10)=15,03$ $p=0,003$; 60 min. ($F(1,10)=14,250$ $p<0,001$).

En los ratones WT, el análisis de la curva temporal indicó que la actividad locomotora alcanzó su nivel máximo a los 40 min comparada con los 10 min iniciales post-inyección, en donde la diferencia es prácticamente significativa ($p=0,051$). Además, se observó que a los 60 min post inyección la actividad locomotora experimentó una gran disminución siendo estadísticamente diferente de la actividad locomotora en los otros periodos de tiempo; esto indicaría al igual que en los ratones p35KO que a la dosis elegida, los efectos del SKF81297 empezarían a decaer luego de aproximadamente 60 min.

Por otro lado, se observó en ratones WT, que el tratamiento con SKF81297 produjo un aumento significativamente diferente con respecto a los que recibieron Sal en todos los intervalos temporales excepto en los 10 min iniciales. Esto fue analizado estadísticamente mediante ANOVAs de una vía (tratamiento) entre ratones WT que recibieron ambos tratamientos realizados en cada uno de los intervalos de tiempo (todos los valores $F>13,889$ y todos los valores $p<0,018$). Esto indicaría que el SKF81297 necesitaría al menos 20 min para comenzar a ejercer sus efectos en los ratones WT y que si bien a los 60 min sus efectos comienzan a decaer, estos aún no han desaparecido del todo.

Finalmente, al comparar el efecto del SKF81297 entre ratones p35KO y WT, aunque se observa un ligero aumento en casi todos los intervalos temporales, estas diferencias no son significativas en ningún tiempo, probablemente indicando que a la dosis utilizada los efectos del SKF81297 podrían haber encontrado un efecto techo (Figura 25b).

4.2 Participación de los receptores D2 en el perfil locomotor de ratones p35KO.

Con el fin de evaluar la funcionalidad de los receptores D2, los ratones p35KO fueron tratados con QNP y HAL, agonistas y antagonistas específicos de D2 respectivamente.

4.2.1 La activación de los receptores D2 presinápticos produce inhibición de la actividad locomotora en ratones p35KO.

Con el fin de evaluar la funcionalidad de los receptores D2 en ratones p35KO, éstos fueron tratados con una dosis de 0,5 mg/kg del agonista específico del receptor de D2 QNP, el cual a la dosis usada, produce sedación locomotora en ratones al actuar en receptores D2 presinápticos (autoreceptores) inhibiendo por medio de estos la liberación de DA (Mercuri y *col.*, 1997). Se emplearon en este experimento 13 ratones p35KO (7 Sal, 4 QNP) y 18 WT (12 Sal, 4 QNP).

Cuando los ratones p35KO y WT fueron inyectados con este fármaco, se observó una robusta disminución en la actividad locomotora en ambos genotipos con respecto a los animales tratados con Sal, como se muestra en la Figura 26a (tratamiento $F(1, 23)=75,848$, $p<0,001$; genotipo $F(1,23)=53,675$, $p<0,001$; interacción $F(1,23)=20,727$ $p<0,001$, Duncan, WT: Sal vs QNP $p=0,009$. p35KO: Sal vs QNP $p<0,001$). Por otro lado, la actividad locomotora de ratones de ambos genotipos que recibieron el tratamiento con QNP no mostraron diferencias significativas.

Este resultado indicaría que los receptores D2 presinápticos son totalmente funcionales en los ratones p35KO, ya que la activación de estos es eficiente para inhibir su actividad locomotora.

Además, se observó que el efecto producido por la administración de este agonista, es ligeramente mayor en los animales p35KO donde dicha droga produce una reducción de 4 veces en la actividad locomotora con respecto a los animales que recibieron Sal, mientras que en los ratones WT esta reducción inducida por QNP fue de aproximadamente 3.35 veces. Además, se observó que la administración de QNP en animales p35KO produce una disminución de la actividad locomotora a niveles menores que en el ratón WT tratado con Sal, aunque esta no fue estadísticamente significativa (comparación planeada p35KO QNP vs WT Sal, $p=0,334$).

La dinámica del efecto de la administración de QNP en ratones de ambos genotipos se analizó de la misma forma que la utilizada para analizar el efecto de los receptores tipo D1. En primer lugar se realizó un ANOVA de tres vías (tratamiento x genotipo x tiempo) con el factor tiempo como medida repetida. Este análisis confirmó, además del efecto del tratamiento ($F(1,23)=77,557$, $p<0,001$) y del genotipo ($F(1,23)=55,977$ $p<0,001$), un efecto del factor tiempo ($F(5,115)=18,367$, $p<0,001$) y de la interacción entre los 3 factores ($F(5,115)=2,643$, $p=0,0267$) (Figura 26b).

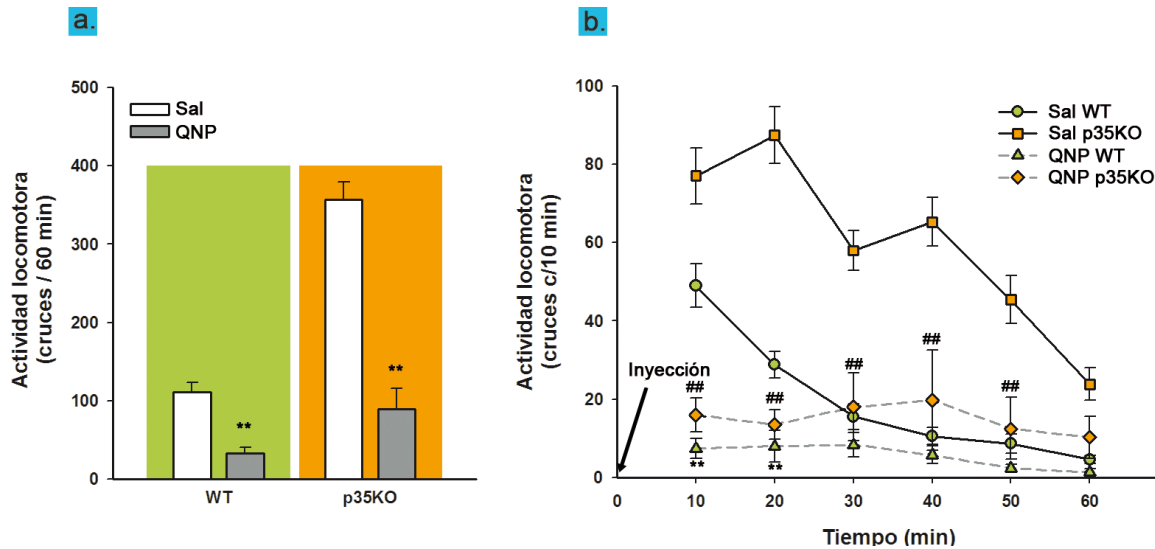


Figura 26: Efectos de la activación farmacológica de los receptores D2 en la actividad locomotora de ratones p35KO y WT. **a.** Actividad locomotora de ratones p35KO y WT tratados con Sal o con 0,05 mg/kg del activador de D2 QNP. Las barras indican la media de la actividad locomotora de los ratones durante 60 min. Se observa que dicho agonista produce una disminución en la actividad locomotora de ratones de ambos genotipos con respecto a los tratados con Sal, como lo indicó un ANOVA de dos vías seguido del test *a posteriori* de Duncan (Interacción genotipo x tratamiento, $F(1,23)=20,727$ $p<0,001$). **b.** Curva temporal del efecto en la actividad locomotora de ratones p35KO y WT tratados con QNP. Cada punto representa la actividad locomotora cada 10 min. Se observa que el tratamiento con dicho agonista produce una disminución en la locomoción de ratones de ambos genotipos observable durante todo el test. ANOVAS individuales en cada tiempo. En b. # Indica diferencias entre ratones p35KO Sal vs. p35KO QNP (todos los $F(1,9)>10,612$ todos los $p<0,01$), y * entre WT Sal y WT QNP (10 min $F(1,14)=17,900$, $p<0,00$; 20 min $F(1,14)=12,207$, $p<0,001$). WT: Sal n=12, QNP n=4; p35KO: Sal n=7; QNP n=4. Las barras de error representan el error estándar de la media. *,# $p<0,05$; **,## $p<0,01$.

En los ratones p35KO tratados con QNP, se observó que a lo largo de los 60 min de duración de la evaluación, la actividad locomotora no difirió entre ninguno de los tiempos. Esto se analizó mediante el test *a posteriori* de Duncan en el cual no se observaron diferencias significativas.

Por otro lado, en los ratones p35KO el tratamiento con QNP produjo una gran disminución en la actividad locomotora con respecto a los tratados con Sal. Esto se observó rápidamente, a partir de los 10 min y se mantuvo durante los restantes periodos temporales, excepto en el intervalo final. Esto se analizó estadísticamente mediante ANOVAs de una vía (tratamiento) individuales en cada tiempo en los que se comparó la actividad

locomotora de los ratones p35KO tratados con QNP o Sal; todos estos ANOVAs mostraron diferencias significativas (todos los $F(1,9) > 10,612$, todos los $p < 0,01$) excepto a los 60 min donde ésta fue cercana a la significancia ($F(1,9) = 3,973$, $p = 0,077$). Este resultado en conjunto al observado durante el curso temporal del efecto del QNP, indicaría que dicha droga comenzaría a ejercer sus efectos rápidamente a los 10 min post-inyección y que estos efectos se mantendrían al menos durante los 60 min del test (Figura 26b).

En los ratones WT, el tratamiento con QNP también produce una marcada disminución durante los 60 min de duración del test. Durante el transcurso de éste, el análisis *a posteriori* de Duncan, no señaló la presencia de diferencias significativas entre ningún periodo temporal, indicando que después del tratamiento con QNP la actividad locomotora de los ratones WT se mantiene constante durante los 60 min del test.

Por otro lado, en ratones WT el tratamiento con QNP produjo una disminución estadísticamente significativa, la cual pudo ser detectada a partir de los 10 min de iniciado el test, ya que esta actividad locomotora difirió de manera significativa con respecto a la actividad de los ratones WT tratados con Sal (ANOVA de una vía, $F(1,14) = 17,900$ $p < 0,001$). Además, se encontraron diferencias significativas entre los ratones WT que recibieron dicho agonista y los tratados con Sal a los 20 min post administración ($F(1,14) = 12,207$, $p < 0,001$), pero no se encontraron diferencias significativas en los tiempos posteriores, probablemente debido a que a partir de los 30 min los ratones WT comienzan a experimentar una disminución espontánea de su actividad locomotora.

Finalmente, al contrastar la actividad locomotora de ratones p35KO y WT que recibieron el antagonista QNP, no se observaron diferencias significativas en ningún intervalo de tiempo indicando, que el efecto de dicho fármaco es similar en ambos genotipos (Figura 26b).

4.2.2 La inhibición de los receptores D2 postsinápticos disminuye la actividad locomotora en ratones de ambos genotipos

El efecto del uso de fármacos que actúan como agonistas del receptor D2 suelen ser confusos, ya que dependiendo si estos receptores se encuentran en la pre o en la postsinapsis sus efectos sobre la actividad locomotora suelen ser antagónicos.

El uso de antagonistas de D2 generalmente se asocia en la literatura a disminución de la actividad locomotora al bloquear la función de D2 en la postsinapsis a las dosis mas

típicamente utilizadas. Sin embargo, se ha demostrado que dosis inferiores a éstas, pueden producir aumentos en la actividad locomotora al bloquear sólo la actividad de D2 presináptica (aumentando la liberación de DA) sin afectar a los receptores postsinápticos. Este fenómeno sería posible debido a que los receptores ubicados en la presinápsis serían muchos más sensibles que los postsinápticos, pudiendo responder a menores dosis de antagonistas, sin embargo, a mayores dosis el efecto del bloqueo de los receptores postsinápticos sería predominante sobre los anteriores (Di Chiara y col., 1977; Lidsky y Banerjee, 1993).

Teniendo en cuenta este fenómeno, se utilizó el antagonista de D2 HAL, a una dosis de 0,1 mg/kg, la cual se conoce que produce una disminución en la actividad locomotora de ratones al inhibir la función de los receptores D2 postsinápticos. Para esto, ratones p35KO y WT fueron tratados con dicha dosis de 0,1 mg/kg de HAL y su actividad locomotora se evaluó en el campo abierto, con el fin de valorar la participación de estos receptores en la hiperactividad exhibida por los ratones p35KO. Se utilizaron 17 ratones WT (12 Sal, 5 HAL) y 14 p35KO (7 Sal, 7 HAL)

Cuando los ratones p35KO y WT recibieron una dosis de 0,1 mg/kg de HAL, ambos experimentaron una disminución en la actividad locomotora con respecto a los tratados con Sal (ANOVA de dos vías, tratamiento: $F(1, 27)=51,892$ $p<0,001$; genotipo: $F(1, 27)=82,778$, $p<0,001$; genotipo x tratamiento $F(1,27)=19,517$ $p<0,001$). El análisis *a posteriori* de Duncan indicó que esta diferencia fue solo significativa entre los ratones p35KO tratados con 0,1 mg/kg de HAL o Sal ($p<0,001$), mientras que en los ratones WT la diferencia entre los que recibieron el antagonista de D2 y los que recibieron Sal estuvo cerca de la significancia estadística ($p=0,059$). Este resultado indicaría que los receptores D2 postsinápticos son totalmente funcionales en el ratón p35KO y que además serían mas sensibles a los efectos sedativos del HAL que los ratones WT, al menos a esta dosis (Figura 27a).

Además, se observó que la administración de 0,1 mg/kg de HAL produjo una disminución de aproximadamente 2,65 veces en los ratones p35KO y de 1,45 veces en los WT con respecto a los que recibieron Sal, indicando que el efecto de dicha dosis fue mucho mayor en los ratones transgénicos.

Finalmente, se observó que la actividad locomotora de los ratones p35KO que recibieron 0,1 mg/kg de HAL se acercó a la de los ratones WT tratados con Sal, no

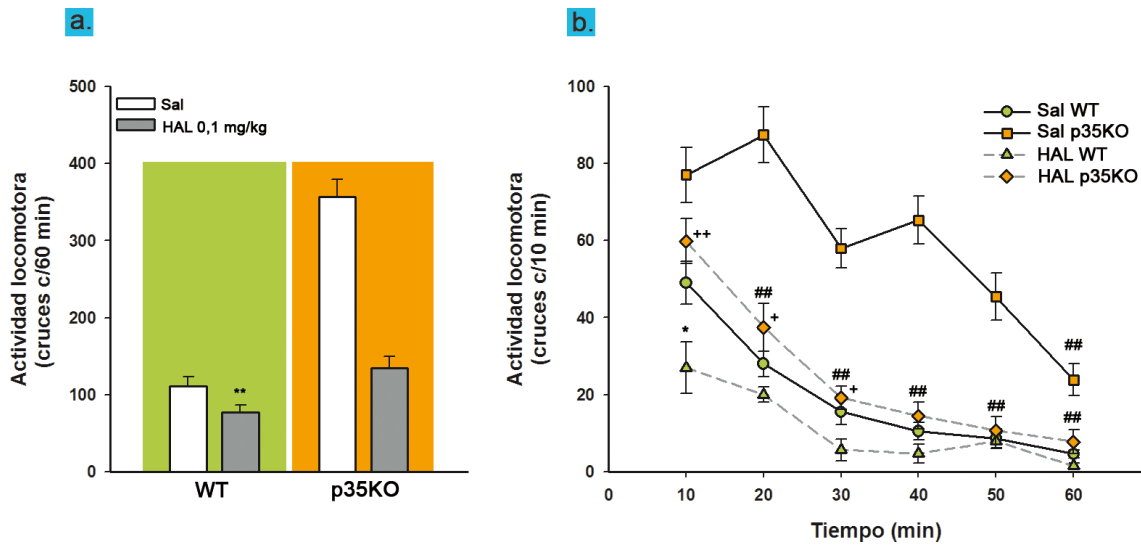


Figura 27: Efectos de la inhibición farmacológica de los receptores D2 postsinápticos en ratones p35KO y WT mediante dosis moderadas de HAL. **a.** Actividad locomotora de ratones p35KO y WT tratados con Sal o con 0,1 mg/kg del inhibidor de D2 HAL. Las barras indican la media de la actividad locomotora de los ratones durante 60 min. Un ANOVA de dos vías (Interacción: genotipo x tratamiento, $F(1,27)=19,517$ $p<0,01$) seguido por el test de Duncan indicaron que HAL produce una disminución estadísticamente significativa en ratones p35KO ($p<0,01$) y cercana a la significancia ($p=0,059$) en los ratones WT con respecto a los tratados con Sal. **b.** Curva temporal del efecto de la actividad locomotora de ratones p35KO y WT tratados con 0,1 mg/kg de HAL. Cada punto representa la actividad locomotora cada 10 min. Se observa que el tratamiento con dicho inhibidor produce una disminución en la locomoción de ratones de ambos genotipos observable durante todo el test. ANOVAS individuales en cada tiempo. En b. # Indica diferencias entre ratones Sal-p35KO vs. HAL-p35KO (todos los $F(1,12)>9,476$ todos los $p<0,01$), * entre Sal-WT y HAL-WT (10 min $F(1,15)=5,824$ $p=0,036$) y + entre HAL-WT y HAL-p35KO (todos los $F(1,10)=5,135$ todos los $p<0,05$). WT: Sal n=12, HAL n=5; p35KO: Sal n=7; HAL n=7. Las barras de error representan el error estándar de la media. *,#,+ $p<0,05$; **,##,++ $p<0,01$.

encontrándose diferencias entre estos (comparación planeada p35KO 0,1mg/kg HAL vs WT Sal, $p=0,145$).

El efecto de la administración de 0,1 mg/kg de HAL sobre la actividad locomotora a lo largo de los 60 min se analizó mediante la observación de ésta cada 10 min, de acuerdo a la metodología estadística previamente explicada en esta sección (Figura 27b). Un ANOVA de tres vías (genotipo x tratamiento x tiempo) indicó un efecto del genotipo ($F(1,27)=86,404$ $p<0,001$), del tratamiento ($F(1,27)=54,591$, $p<0,001$) y del tiempo ($F(5,135)=69,823$, $p<0,001$), además de la interacción entre los tres factores ($F(5,135)=5,905$, $p<0,001$) (Figura 27b).

En los ratones p35KO se observó un cambio en la actividad locomotora en los ratones tratados con 0.1 mg/kg de HAL a lo largo de los 60 min en que transcurrió el test. El análisis *a posteriori* de Duncan, indicó que a partir de los 30 min de iniciado el test, la actividad locomotora es significativamente menor en éste y todos los tiempos siguientes con respecto a los dos periodos iniciales (todos los valores $p < 0,01$). Además, este análisis no detectó diferencias significativas entre el tiempo 30 min y los intervalos restantes. Estos resultados indicarían que el efecto del 0,1 mg/kg de HAL alcanzaría un nivel máximo a los 30 min post-inyección.

Por otro lado, la comparación entre ratones p35KO que recibieron el tratamiento con HAL o Sal, indica que este fármaco produce una marcada disminución de la actividad locomotora con respecto a los que recibieron Sal. Esto se observó mediante ANOVAs individuales de una vía (tratamiento) realizados en cada periodo temporal. Estos análisis indicaron que a los 10 min, el tratamiento con dicho antagonista produce una disminución cercana a la significancia estadística ($F(1,12)=30,502$, $p=0,08$) respecto a los ratones que recibieron Sal, y que esta disminución fue estadísticamente significativa a partir de los 20 min, manteniéndose durante el resto del test (todos los $F(1,12) > 9,476$, todos los $p < 0,01$).

En los ratones WT, el test *a posteriori* de Duncan, indicó la presencia de diferencias significativas entre los dos primeros tiempos (10 y 20 min) en comparación con los restantes (todos los $p < 0,05$), excepto entre el tiempo 20 min y 50 min ($p=0,062$).

Además, en ratones WT se observaron diferencias significativas en la actividad locomotora entre los que recibieron 0,1 mg/kg de HAL con respecto a los animales que recibieron Sal sólo a los 10 min (ANOVA de una vía, $F(1,15)=5,824$, $p=0,036$), siendo en los tiempos restantes, indistinguibles desde el punto de vista estadístico; esto último se debería probablemente a que los animales WT tienen una tendencia natural a disminuir su actividad locomotora a lo largo del tiempo.

Finalmente, entre animales p35KO y WT tratados ambos con 0,1 mg/kg de HAL, se observaron diferencias significativas en los tiempos 10, 20 y 30 min (ANOVAs de una vía, todos los $F(1,10) > 5,315$, todos los $p < 0,05$) tiempos en los que el antagonista de D2 aun no ha alcanzado su efecto máximo en los ratones transgénicos, pero no se observaron diferencias significativas en los tiempos siguientes.

4.2.3 Respuesta alterada a bajas dosis de haloperidol en ratones p35KO.

Dosis muy bajas de HAL producen un aumento de la actividad locomotora en ratas y ratones al bloquear el tono inhibitorio que los receptores D2 presinápticos ejercen sobre la liberación de DA, es decir, bajas dosis de esta droga produce un aumento en la actividad locomotora de animales sanos al inducir un aumento en la liberación de DA (Dias y col., 2012). Con esta idea en mente, tratamos a los ratones p35KO y WT con 0,03 mg/kg de HAL, dosis a la cual se ha citado produce un aumento en la actividad locomotora (Dias y col., 2012), con el fin de evaluar si la autoinhibición de la liberación de DA mediada por los receptores D2, podría estar alterada en los ratones p35KO. El efecto de este tratamiento sobre la actividad locomotora se analizó mediante el paradigma de campo abierto durante los 60 min post-administración. Se utilizaron en este experimento 19 animales WT (12 Sal, 7 HAL) y 12 p35KO (7 Sal, 5 HAL).

Cuando ratones p35KO y WT recibieron una dosis de 0,03 mg/kg de HAL y se evaluó su actividad locomotora, se observó de acuerdo a lo esperado, un aumento en la actividad locomotora de los ratones WT, sin embargo, de manera interesante los ratones p35KO mostraron una disminución significativa en su actividad (Figura 28a). Este resultado se analizó a través de un ANOVA de dos vías (genotipo x tratamiento) en el cual se observó un efecto del genotipo ($F(1,27)=27,351$, $p=0,006$), del tratamiento ($F(1,27)=15,039$, $p<0,001$) y de la interacción entre ambos factores ($F(1,27)=55,019$ $p<0,001$). Además, el test *a posteriori* de Duncan confirmó la presencia de diferencias significativas en la actividad locomotora de ratones WT que recibieron 0,03 mg/kg de HAL con respecto a los que recibieron Sal ($p=0,024$) y en la disminución observada en ratones p35KO luego del tratamiento farmacológico con respecto a los tratados con Sal ($p<0,001$). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre ratones p35KO y WT tratados con 0,03 mg/kg de HAL, aunque la actividad de los ratones transgénicos fue levemente mayor. Finalmente, el tratamiento farmacológico produjo que la actividad locomotora de ratones p35KO se acercara a los niveles normales de locomoción presentado por los ratones WT tratados con Sal, no mostrando diferencias significativas (comparación planeada WT Sal vs. KO 0,03 mg/kg HAL, $p=0,34$).

Por otro lado, cabe destacar que la disminución producida en el raton p35KO por la administración de 0,03 mg/kg de HAL fue similar a la observada luego de la administración

de la dosis de HAL de 0,1 mg/kg (Figura 28a); un ANOVA de una vía entre la actividad locomotora de los ratones p35KO tratados con 0,03 y 0,1 mg/kg de HAL no indicó diferencias significativas entre los animales que recibieron dosis distintas ($F(1,10)=0,483$, $p=0,82$).

El efecto de la administración de 0,03 mg/kg de HAL en la actividad locomotora durante los 60 min de evaluación de ratones de ambos genotipos (Figura 28b) se analizó de la misma manera que en el apartado anterior. Para esto, se registró la actividad locomotora cada 10 min durante un periodo de 60 min y estos valores se analizaron mediante una ANOVA de tres vías, (genotipo x tratamiento x tiempo), de medidas repetidas (tiempo). A continuación se realizó un análisis *a posteriori* de Duncan con el fin de detectar diferencias entre los distintos periodos temporales.

El análisis de la actividad locomotora mostró la presencia de un efecto del genotipo ($F(1,27)=28,255$, $p<0,01$, del tratamiento ($F(1,27)=15,232$, $p<0,001$) y del tiempo ($F(5,135)=3,345$, $p=0,007$), y de la interacción entre los tres factores ($F(5,135)=6,666$, $p<0,001$).

En ratones p35KO, se observó una disminución a lo largo de los 60 min de duración del test en los animales que recibieron el tratamiento con 0,03mg/kg de HAL. En estos ratones, el test *a posteriori* indicó diferencias significativas entre todos los intervalos de tiempo con respecto al min 10 (todos los $p<0,001$), excepto entre los dos primeros (10 min vs. 20 min) donde estos valores se acercaron a la significancia estadística ($p=0,075$). Esto indica que a partir de los 20 min, el efecto de esta dosis de HAL es completo y que esta se mantiene activa al menos durante el tiempo restante que duró la evaluación.

Por otro lado, en ratones p35KO tratados con 0,03 mg/Kg de HAL en comparación con aquellos que recibieron Sal del mismo genotipo. ANOVAs individuales (una vía, tratamiento) realizados en cada tiempo, mostraron diferencias significativas en todos los periodos temporales (todos los $F(1,10)>6,779$ y todos los $p<0,05$) excepto en el tiempo 60 min; en los cuales se observó que la actividad locomotora en los animales que recibieron el antagonista de D2 fue menor a los tratados con Sal.

En los ratones WT que recibieron 0,03 mg/kg de HAL, se observó una disminución en la actividad locomotora a lo largo del tiempo, la cual, como demostró el análisis *a posteriori* de Duncan, es significativamente menor a partir del tiempo 30 min con respecto al tiempo inicial (todos los $p<0,009$).

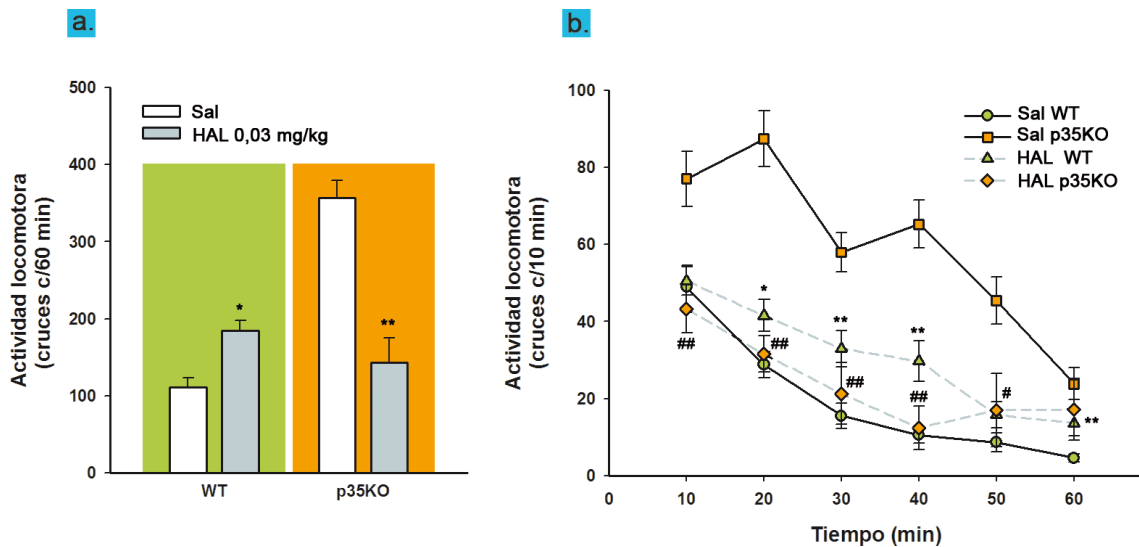


Figura 28: Efecto de la inhibición farmacológica de los receptores D2 presinápticos de ratones p35KO y WT mediante dosis bajas de HAL. **a.** Actividad locomotora de ratones p35KO y WT tratados con Sal o con 0,03 mg/kg del inhibidor de D2 HAL. Las barras indican la media de la actividad locomotora de los ratones durante 60 min. Se observa que dicho antagonista produce un aumento en la actividad locomotora de ratones WT con respecto a los tratados con Sal, mientras que en ratones p35KO induce una reducción en la locomoción en comparación a los tratados con Sal, como lo indicó un ANOVA de dos vías (interacción genotipo por tratamiento, $F(1,27)=55,019$, $p<0,001$) seguido por el tes *a posteriori* de Duncan. **b.** Curva temporal del efecto de la actividad locomotora de ratones p35KO y WT tratados con 0,03 mg/kg de HAL. Cada punto representa la actividad locomotora cada 10 min.

Se observa que el tratamiento con dicho inhibidor produce que la actividad locomotora de los ratones WT sea mayor que la de los tratados con Sal del mismo genotipo, mientras que en ratones p35KO esta es menor en todos los tiempos con respecto a los tratados con Sal. ANOVAS individuales en cada tiempo. En b. # Indica diferencias entre ratones Sal-p35KO vs. HAL-p35KO (todos los $F(1,10)>6,779$ todos los $p<0,05$), y * entre Sal-WT y HAL-WT (todos los $F(1,17)=6,38$ $p<0,022$). WT: Sal n=12, HAL n=7; p35KO: Sal n=7; HAL n=5. Las barras de error representan el error estándar de la media. *,#, $p<0,05$; **,##, $p<0,01$.

Por otro lado, al comparar la actividad locomotora de los ratones WT tratados con 0,03 mg/kg de HAL, en comparación a los tratados con Sal, se observó que el tratamiento farmacológico produce un aumento en la actividad locomotora con respecto a la de los ratones con el tratamiento control; esto se demostró mediante ANOVAs individuales en cada tiempo (ANOVAs de una vía, tratamiento) en el que la actividad locomotora de los ratones tratados con HAL 0,03 mg/kg fue significativamente mayor en casi todos los tiempos (todos los $F(1,17)>6,38$, todos los $p<0,022$) excepto a los 10 y 50 min.

Finalmente al comparar la actividad locomotora de los ratones de ambos genotipos tratados con 0,03 mg/kg de HAL, se observó que ésta fue ligeramente mayor en los ratones WT hasta los 40 min del test, sin embargo, solo en dicho tiempo estas diferencias estuvieron cerca de ser estadísticamente significativas (ANOVA de una vía, tratamiento, $F(1,10)=4,989$, $p=0,051$), tiempo en que la actividad de los ratones p35KO alcanza su valor mínimo. En los tiempos restantes (50 y 60 min) la actividad locomotora entre ratones de ambos genotipos es indistinguible.

DISCUSION

En este trabajo de tesis demostramos, por primera vez, que las alteraciones en la función del complejo CDK5/p35 en ratones juveniles producen un fenotipo conductual hiperactivo, reversible mediante el uso de psicoestimulantes y con menores niveles de ansiedad. Estos comportamientos estarían relacionados con las desregulaciones en la síntesis y utilización de DA encontradas en estos ratones transgénicos. Finalmente demostramos que el funcionamiento de los receptores de DA D1 y D2 es necesario para la expresión de la hiperactividad locomotora en dichos ratones. Este perfil conductual y bioquímico, atribuible a la disfunción de CDK5, es similar al los encontrados en diversos modelos animales de TDAH.

Si bien el ratón p35KO ha sido muy usado en estudios relacionados con maduración y formación de sistema nervioso central que incluyen migración neuronal y formación de sinapsis (Kwon y Tsai, 1998; Kwon *y col.*, 2000; Ko *y col.*, 2001), este prácticamente no ha sido caracterizado conductualmente. En este contexto, nuestro trabajo es uno de los primeros en estudiar características claves del comportamiento del ratón p35KO, y además es el único en el que se utilizan ratones juveniles. Por otro lado, al momento de la publicación de la primera parte de nuestros resultados, (Krapacher *y col.*, 2010), dicho trabajo representó la primera asociación en entre *cdk5* y TDAH. Posteriormente, parte de nuestros resultados fueron confirmados por otro grupo de investigación (Drerup *y col.*, 2010).

En primer lugar observamos que los ratones juveniles de 24 días de edad, carentes de la proteína p35, presentan niveles de actividad locomotora espontánea aproximadamente 2 veces mayores que los ratones WT cuando ésta se evaluó durante 70 min en el campo abierto. Sumado a esto, se observó que la actividad locomotora de los ratones p35KO y WT fue indistinguible en los 10 min iniciales del test, lo que indicaría que la actividad exploratoria inicial a un ambiente novedoso sería similar en ratones de ambos genotipos. Por otro lado, a partir de los 20 min de evaluación, la actividad locomotora de los animales WT comenzó a disminuir a medida que progresaba el tiempo del test, sin embargo, en los ratones p35KO ésta aumentó ligeramente con respecto al tiempo inicial y se mantuvo en niveles constantes durante todo el tiempo de la evaluación. Esto indicaría que, si bien la exploración inicial sería

normal en el ratón p35KO, éste presentaría déficits en procesos de habituación al contexto. Además, el análisis temporal indica que los mayores niveles de actividad locomotora en los ratones p35KO sería resultado de que ésta se mantiene elevada durante todo el test y no debido a una mayor velocidad en la locomoción.

Por otro lado, cuando la actividad locomotora se evaluó en animales de entre 50-75 días de edad, no se encontraron diferencias significativas entre ambos genotipos, indicando que la hiperactividad encontrada en los ratones p35KO se encuentra restringida a edades juveniles, al menos con nuestros parámetros de experimentación.

No existen registros previos de hiperactividad en ratones p35KO juveniles, sin embargo, posteriormente a que nosotros publicáramos estos resultados (Krapacher y *col.*, 2010), Drerup y *col.* (2010) publicaron resultados similares a los nuestros, los cuales confirman que ratones p35KO presentan niveles elevados de actividad locomotora. A pesar de que los resultados entre dicho trabajo y el nuestro son similares, existen algunas diferencias, siendo la más importante que éste grupo encuentra hiperactividad en los ratones p35KO a edades adultas tratados con Sal. Esta diferencia podría deberse a que el rango de edades usado en dicho trabajo es muy amplio, de entre 40 y 85 días, mientras que nosotros evaluamos la actividad de los animales adultos a partir del día postnatal 60 y 75 en una ventana temporal mucho mas restringida y se realizó en ratones sin ningún tratamiento previo. Además, existen diferencias en el protocolo de registro de la actividad locomotora y de habituación previa a la caja de registro. Sin embargo, mas allá de estas diferencias, este trabajo apoya nuestra observación de que una desregulación sostenida en el tiempo de CDK5 produce un fenotipo hiperactivo en ratones carentes del activador p35.

Diferentes estudios indican que la inhibición farmacológica de CDK5 mediante roscovitina u olomoucina no producen aumentos en la actividad locomotora de ratas o ratones, lo que indicaría que en animales sanos, solo la inhibición de CDK5 por periodos acotados de tiempo no sería suficiente para producir este fenómeno, sin embargo la inhibición constitutiva de la actividad de CDK5 debido a la ausencia de p35 durante todo el desarrollo, produciría alteraciones que desencadenarian este tipo de comportamientos.

Este patrón de actividad locomotora encontrado en el ratón p35KO es por definición la característica clave de todo modelo de TDAH (Russell, 2011). LA hiperactividad locomotora se encuentra en los modelos animales mas ampliamente aceptados y utilizados de TDAH, los

cuales incluyen a ratas y ratones tratados periatalmente con 6-OHDA, ratas SHR y ratones DAT-KO (Russell, 2011). Además, los ratones p35KO presentan hiperactividad solo a edades juveniles, lo que según Sagvolden y *col.* (2005b) es una característica muy importante en todo modelo animal de TDAH, debido a que en pacientes la hiperactividad comienza a disminuir durante la adolescencia; sin embargo, para otros autores, teniendo en cuenta que el TDAH se mantiene durante toda la vida adulta, ésta característica no sería crucial (van der Kooij y Glennon, 2007). En este sentido, nuestro ratón transgénico sería similar a lo observado en animales tratados con 6-OHDA o sometidos a hipoxia perinatal, en los cuales la hiperactividad desaparece aproximadamente a partir de la sexta semana de edad (Shaywitz y *col.*, 1976a; Gramatte y Schmidt, 1986), en contraposición a otros modelos como las ratas SHR o NHE y los ratones DAT-KO en los cuales la hiperactividad puede encontrarse también a edades adultas (Sadile y *col.*, 1993; Sagvolden y *col.*, 1993b; Gainetdinov y *col.*, 1999).

Otra característica altamente buscada en los modelos de TDAH, es que estos animales, al ser tratados con psicoestimulantes reduzcan sus niveles de actividad locomotora (Russell y *col.*, 2005; Wickens y *col.*, 2011). Nosotros administramos a los ratones p35KO y WT con dosis bajas de ANF (0,2; 0,5 y 1,0 mg/kg) y MTF (0,5; 1,0 y 2,0 mg kg), en un rango cercano al utilizado en el tratamiento farmacológico de niños con TDAH. En primer lugar, observamos que en ratones WT, la tres dosis utilizadas de ANF o MTF producen un marcado incremento en la actividad locomotora, sin embargo, otros trabajos no encuentran efectos en la actividad locomotora a dichas dosis (Xu y *col.*, 2000; Berridge y *col.*, 2006; Tilley y Gu, 2008). Estas diferencias pueden deberse a que estos trabajos fueron realizados en animales adultos, en ratas y/o a que los animales fueron previamente habituados a las cajas de registro. Por otro lado, en ratones p35KO encontramos que las 3 dosis elegidas, tanto de ANF o MTF produjeron una marcada y persistente disminución en la actividad locomotora, permaneciendo disminuida durante los 60 min posteriores a la administración de la misma. Además, se observó que la actividad locomotora de los ratones p35KO tratados con psicoestimulantes alcanzó niveles similares a los observados en ratones WT tratados con Sal, indicando que el uso de dichos fármacos normalizara los niveles de actividad locomotora en los ratones p35KO.

Estos resultados, conjuntamente con los anteriores, indican que el ratón p35KO puede modelar características claves del TDAH. Además, debido a que es altamente

conocido que los psicoestimulantes producen aumentos en la locomoción en animales sanos y sus efectos sedativos en modelos de TDAH, principalmente afectando la regulación dopaminérgica (Arnsten, 2006), estos resultados nos indicarían que la existencia de alteraciones en este sistema de neurotransmisión estarían relacionadas con la hiperactividad encontrada en el ratón p35KO .

El hecho de que ratones carentes de p35 disminuyan su actividad locomotora al ser tratados con psicoestimulantes sería contradictorio con trabajos donde se ha encontrado que la inhibición farmacológica de CDK5 potencia los efectos de la administración de psicoestimulantes (Bibb y *col.*, 2001), sin embargo, posiblemente la falta de función constitutiva de esta quinasa durante todo el desarrollo produciría otro tipo de efectos. Este resultado obtenido por nosotros, se corresponden con el trabajo de Drerup y *col.* (2010), en el cual encuentran que la administración crónica de COC y MTF producen una disminución gradual de la actividad locomotora de ratones p35KO.

A continuación, evaluamos a nuestros ratones en el LCE, una prueba de ansiedad, ya que se ha reportado que varios animales usados como modelos de TDAH suelen presentar menores niveles de este tipo de comportamientos. Cuando se evaluó a los ratones de ambos genotipos se observó, de acuerdo a lo esperado, que los ratones WT exploraron todos los brazos del LCE y luego evitaron activamente ingresar a los brazos abiertos, a los cuales solo ingresaron en un 30% del total de entradas a ambos brazos y permanecieron en éstos menos del 30 % del tiempo total de evaluación. Por otro lado, los ratones p35KO no evidenciaron preferencia por ninguno de los dos brazos, entrando y permaneciendo en la misma medida en ambos tipo de brazos. Además, se observó que el número de entradas totales a ambos brazos fue indistinguible entre los genotipos, indicando que la hiperactividad locomotora presentada por los ratones p35KO no influye en el resultado de este experimento. Este test indicaría que los ratones p35KO presentan menores niveles de comportamientos tipo-ansiedad, lo que se corresponde con lo observado en otros modelos de TDAH, como ratas lesionadas con 6-OHDA, ratas SHR y ratones DAT-KO juveniles, en donde estos animales presentaron menores niveles de ansiedad cuando fueron evaluados en el LCE (Avale y *col.*, 2004b; Calzavara y *col.*, 2004; Carpenter y *col.*, 2012). Adicionalmente, otro grupo de investigación observó que en una cepa de ratones seleccionados a partir de bajos niveles de ansiedad en el LCE, éstos (Bibb y *col.*, 2001) presentan altos niveles de actividad locomotora

reversible mediante el uso de ANF, indicando una co-segregación entre ansiedad e hiperlocomoción (Yen *y col.*, 2013).

Por otro lado, los resultados observados en los ratones p35KO son consistentes con las observaciones realizadas por Bignante *y col.* (2008 y 2010). En estos trabajos, encontraron que la inducción de estrés por inmovilización en ratas produce un aumento en los niveles de expresión de p35 y en la actividad de CDK5 en amígdala basolateral (ABL) y en el septum lateral del hipocampo (SLH), lo cual es acompañado por un aumento en los niveles de ansiedad en el LCE. Además, observaron que tanto en ratones p35KO, como en ratas a las cuales se les administró el inhibidor de CDK5 olomoucina, intra ABL o SLH, el estrés previo no produjo aumentos en los niveles de ansiedad (Bignante *y col.*, 2008; Bignante *y col.*, 2010). Estos resultados indicarían que la función de CDK5 es esencial para la expresión de comportamientos ansiogénicos, lo cual estaría de acuerdo con la falta de este tipo de comportamientos encontrados en nuestros ratones p35KO.

Por otro lado, se ha observado recientemente en un ratón transgénico al cual se le ha delecionado el gen que codifica para la proteína caseína quinasa 2 (CK2) en NSM del Str que expresan el receptor D1, hiperactividad y falta de comportamientos ansiosos en el LCE, los cuales pueden ser revertidos mediante el uso de SCH23390; mientras que estos comportamientos están ausentes si esta delación se induce en neuronas que expresan D2 en la misma área (Rebholz *y col.*, 2013). La CK2 en el Str cumple una función análoga y complementaria a CDK5 al regular negativamente la función de los receptores D1 (Rebholz *y col.*, 2009), lo cual se corresponde con un aumento en los niveles de DARPP-32_{pTre34} en dichos ratones transgénicos luego de la estimulación de estos receptores (Rebholz *y col.*, 2013), lo que indicaría que la sobreactivación de esta vía de neurotransmisión podría estar relacionada con el establecimiento de falta de conductas tipo-ansiedad e hiperactividad. Un fenómeno similar podría estar sucediendo en el ratón p35KO, en el cual la disfunción de CDK5 se traduciría en un aumento de la eficiencia de la vía D1/PKA-DARPP-32_{pTre34} al no poder CDK5 fosforilar DARPP-32_{pTre75} e inhibir PKA (Bibb *y col.*, 1999). Debido a esto, en los ratones p35KO la ausencia de comportamientos tipo-ansiedad podría estar relacionada con una sobreactivación del receptor D1 similar a lo encontrado en el ratón transgénico para CK2.

Por otro lado, teniendo en cuenta que el LCE es considerado un test de aproximación/evasión, diversos autores consideran que falta de evasión por los brazos

abiertos o falta de preferencia por alguno de los tipos de brazos puede interpretarse como una menor capacidad para inhibir una respuesta o una pobre inhibición comportamental, más que una medida de falta de ansiedad (Mormede y *col.*, 2002; Avale y *col.*, 2004b). Esta falta de inhibición de acciones, las cuales exponen a un animal a situaciones potencialmente peligrosas, puede considerarse un tipo específico de impulsividad (Evenden, 1999). De acuerdo a esto, dicha interpretación podría extenderse a lo observado por nosotros en los ratones p35KO, los cuales no evidencian ningún tipo de conflicto en el LCE. Esto podría estar indicando que los ratones p35KO presentarían un déficit en inhibir una respuesta cuando se enfrentan a una señal que indica detenerse (señal “no-go”). La pobre inhibición comportamental es una de las características más importantes de los pacientes con TDAH, los cuales comúnmente presentan peores puntuaciones en test de inhibición de respuestas (test go/no-go) que la población sana (Nigg, 2001). Finalmente, si bien se ha encontrado comorbilidad entre TDAH y trastornos de ansiedad, se piensa que este último sería una consecuencia emocional del paciente al diagnóstico original, por lo que la ansiedad no sería una característica clave de este trastorno (Taurines y *col.*, 2010). Teniendo en cuenta esto, es probable que el patrón de comportamiento exhibido por los ratones p35KO en el LCE, se deba a una pobre capacidad de inhibir respuestas y no a mecanismos de ansiedad, lo que sería un indicador de impulsividad, sin embargo, test conductuales más específicos serían necesarios para poder confirmar esta idea.

A continuación, debido a que los niveles de actividad locomotora están relacionados con los niveles de DA y a que CDK5 es un importante regulador de la enzima TH, decidimos evaluar la síntesis de este neurotransmisor. En primer lugar, esto se realizó en animales de 24 días de edad, dado que fue a esta edad donde se detectó hiperactividad en los ratones p35KO.

La síntesis de DA se evaluó en Str, debido a que este es uno de los principales núcleos relacionados con la regulación de la actividad locomotora y además una de las principales zonas de acción de los psicoestimulantes (Groenewegen y Trimble, 2007). Cuando evaluamos la concentración de la enzima TH, observamos mediante tinciones inmunohistoquímicas e inmunoblot, que los ratones p35KO presentan niveles mayores de esta enzima tanto en Str como NAc con respecto a los animales WT. Sumado a esto, encontramos que este mayor nivel de TH se correlaciona con mayores niveles de

acumulación de DA. Asimismo, demostramos que los mayores niveles de DA encontrados en el ratón p35KO se deben a una mayor síntesis de este neurotransmisor. Esto se demostró a través de la determinación de los niveles de acumulación de L-DOPA mediante el uso del inhibidor NSD-1015, en donde encontramos que ratones p35KO presentan mayores niveles de este metabolito que los ratones WT. El fármaco NSD-1015 bloquea la conversión de L-DOPA a DA, y teniendo en cuenta que L-DOPA no es susceptible de ser degradada, la concentración de esta representa un indicador más preciso de la de síntesis de DA y puede ser interpretado como una medida indirecta de la actividad de TH.

Se ha citado que TH es fosforilada por CDK5 en la Ser31, lo que aumenta su estabilidad y actividad (Moy y Tsai, 2004). Debido a esto, la falta de función de dicha quinasa debería provocar que los ratones p35KO presentaran menores niveles de TH, sin embargo, encontramos un aumento en los niveles de dicha enzima. Esto posiblemente se deba a que otros mecanismos podrían estar compensando la alteración de la función de CDK5. Estos mecanismos podrían ser tanto a nivel transcripcional y traduccional, aumentando los niveles de síntesis del RNAm para TH y aumentando su traducción a proteína; como también a nivel postraduccional por fosforilación de diferentes quinanas, sin embargo para poder confirmar esta afirmación serían necesarios experimentos adicionales. Por otro lado, Moy y Tsai, indican que los ratones CDK5-KO presentan menores niveles de TH con respecto a los animales WT (Moy y Tsai, 2004), sin embargo, esta discrepancia con nuestros datos probablemente se deba a que en dicho trabajo, los niveles de esta enzima se determinaron en ratones de 16 días de edad gestacional, por lo que estos datos no serían comparables con los nuestros. Además, en nuestro ratón, la proteína de p39 podría rescatar, al menos en parte, la función de p35.

Por otro lado, de manera conjunta con la normalización de la actividad locomotora, los ratones p35KO adultos no presentaron diferencias en los niveles de TH, ni de DA con respecto a los animales WT de su misma edad. Además, en animales adultos, se evaluaron los niveles de acumulación del metabolito de DA, DOPAC, el cual es producido en ratones principalmente a partir de la DA liberada que no es rápidamente reciclada dentro de las vesículas sinápticas, lo cual puede utilizarse, con ciertas reservas, como una medida de la liberación o utilización de DA. En ratones adultos, no se observaron diferencias en los niveles de DOPAC, ni del cociente DOPAC/DA, entre ratones de ambos genotipos, indicando que

conjuntamente con niveles normales de DA, los ratones p35KO adultos no presentan alteraciones en la tasa de utilización de este neurotransmisor.

De acuerdo con estas observaciones en animales adultos, se ha citado que los niveles de expresión de p35 gradualmente comienzan a declinar con la edad (Delalle y *col.*, 1997), por lo que muchas funciones llevadas a cabo por esta quinasa probablemente son relevadas por otros sistemas de señalización intracelular, por lo que la normalización de los niveles de TH en ratones p35KO, podría ser consecuencia de que con la edad adulta, otros sistemas serían los principales responsables de la regulación de esta enzima. Este resultado es similar a lo encontrado por Drerup y *col.* (2010), en donde no encuentran diferencias en los niveles de DA y DOPAC entre ratones p35KO y WT adultos.

Por otro lado, a diferencia de lo encontrado en ratones adultos, observamos en animales juveniles (tratados con Sal), que los ratones p35KO, presentan menores niveles del metabolito DOPAC, en comparación con los animales WT. Esto, sumado al hecho de que los animales p35KO, presentan niveles totales de DA mayores que el de los ratones WT, se traduce en una tasa de recambio de DA (DOPAC/DA) marcadamente inferior en los ratones transgénicos. Un menor metabolismo de DA puede manifestarse en un número diverso de situaciones, que incluyen mayor síntesis de DA pero con menor liberación, menor recaptación debido a funcionamiento anormal de DAT o menor metabolismo por parte de la enzima MAO.

Por otro lado, se observó que el tratamiento farmacológico con 0,5 mg/kg de ANF o 0,5 mg/kg de MTF provocaron una disminución de los niveles totales de DA en ratones p35KO con respecto a los tratados con Sal, alcanzado estos ratones, niveles similares de acumulación de DA a los encontrados en ratones WT.

Además, paralelamente a esto, el tratamiento con dichos psicoestimulantes produjo un marcada disminución en los niveles de expresión de TH en los ratones p35KO. Este último dato indicaría que el rápido descenso en los niveles de DA observado en los ratones p35KO después del tratamiento con psicoestimulantes sería resultado de la disminución observada conjuntamente en los niveles de la enzima TH. Esta rápida disminución en los niveles de TH observada después del tratamiento con ANF o MTF en ratones p35KO, probablemente estaría relacionada con la falta de una correcta función de CDK5 en los ratones transgénicos. CDK5 fosforila a TH en la Ser31, aumentando su estabilidad (Moy y Tsai, 2004), por lo cual

alteración de la función de dicha quinasa, produciría que TH se encuentre en un estado menos estable y más susceptible a la degradación, lo que explicaría su rápida caída luego del tratamiento con psicoestimulantes. Por otro lado, apoyando esta idea se ha observado una disminución en el número de fibras TH positivas en ratas periadolescentes inmediatamente después de ser tratadas con MTF (Gray y *col.*, 2007).

Cabe destacar, que se ha citado que el tratamiento con ANF o metanfetamina producen aumentos en la síntesis de DA, a través de un mecanismo dependiente de Ca^{2+} (Fung y Uretsky, 1982; Larsen y *col.*, 2002), lo cual se contradice con lo observado en los ratones p35KO, donde encontramos el efecto opuesto. Probablemente esta discrepancia esté relacionada con las consecuencias de la falta de la correcta función de CDK5 en la regulación de la actividad y estabilidad de TH. Por otro lado, tampoco se observó aumentos en los niveles de DA en ratones WT, esta diferencia podría explicarse por el hecho de que nosotros utilizamos una dosis de baja (0,5mg/kg) de ANF, mientras que para inducir un aumento en la síntesis de DA, se necesitan dosis mayores (1,0 o 2,0 mg/kg) (Fung y Uretsky, 1982).

Por otro lado, conjuntamente con estos cambios, observamos que el tratamiento con psicoestimulantes produjo un notable aumento en el metabolismo de DA en ratones p35KO, como lo indica el cociente DOPAC/DA, alcanzando niveles similares a los hallados en los ratones WT. Observamos que tanto ANF como MTF provocaron un leve aumento (aunque significativo) en los niveles de DOPAC en ratones p35KO con respecto a los tratados con Sal. Este dato en conjunto con la disminución inducida por dicho tratamiento en los niveles de DA en los ratones transgénicos, resultaron en el marcado aumento observado en DOPAC/DA. Esta última observación indicaría que la disminución en la concentración de DA sería la principal responsable del aumento de DOPAC/DA.

La interpretación del cambio de los niveles de los metabolitos de DA luego de la administración de psicoestimulantes puede ser confusa, debido a que si bien este tipo de fármacos afecta la utilización y recambio de DA, también interfieren indirectamente afectando el metabolismo de ésta. Nosotros observamos un ligero aumento en los niveles de DOPAC en ratones p35KO tratados con ANF. Esta droga aumenta la cantidad de DA en el espacio sináptico a través de la translocación de la DA desde las vesículas sinápticas hacia el citosol y el posterior transporte reverso de esta a través de DAT hacia el espacio sináptico. Esto produce un gran aumento en la concentración citosólica de DA, lo que debido a su

metabolismo debería producir un gran aumento en los niveles de DOPAC, sin embargo, ANF actúa como un potente inhibidor de MAO-A, disminuyendo la conversión de DA libre sea convertida a DOPAC (Robinson, 1985; Sulzer, 2011). Debido a esto, la determinación de los niveles de DOPAC luego del tratamiento con ANF en los ratones p35KO, podría estar subestimando los cambios reales en la utilización y metabolismo de la DA.

De la misma manera, el uso de MTF podría afectar los niveles de DOPAC independientemente de sus efectos en la utilización de DA. MTF actúa mediante el bloqueo de DAT, lo cual produce un aumento de la DA en el espacio sináptico al no poder esta ser transportada nuevamente hacia el interior de la neurona (Sulzer y *col.*, 2005). Esto a su vez produce una disminución en los niveles de la DA en el citosol susceptible de ser degradada a DOPAC, por lo cual la producción de este podría disminuir. Debido a esto, nuevamente, la medida de la producción de DOPAC podría estar infravalorando los cambios en la utilización real de DA en los ratones p35KO luego del tratamiento farmacológico.

En contraposición con nuestro trabajo, Drerup y *col.*, encontraron una disminución en los niveles de DOPAC en ratones p35KO, pero estos experimentos fueron llevados a cabo en ratones adultos tratados crónicamente con 10 mg/kg de MTF durante cinco días, sin embargo este tratamiento disminuyó considerablemente los niveles de DA, lo cual aparentemente indica un aumento en la tasa DOPAC/DA en ratones p35KO que recibieron este tratamiento con respecto a los tratados con Sal, aunque en dicho trabajo no reportan este resultado. Por otro lado, este grupo analizó los niveles del metabolito HVA y su tasa de recambio HVA/DA, encontrando que el tratamiento con MTF produce un aumento de dicho cociente, consistente con una mayor utilización de DA. En nuestro trabajo, intentamos determinar los niveles de HVA, pero los mismos se encontraron por debajo del límite de detección de la técnica y el equipamiento utilizado.

Hasta este punto, hemos demostrado que la falta de una correcta función del complejo CDK5/p35 produce en ratones juveniles un fenotipo conductual hiperactivo relacionado con desregulaciones en la síntesis y metabolismo de la DA.

Teniendo en cuenta que la actividad locomotora es altamente regulada por DA y que la correcta integración de señales a través de sus receptores es crucial para la normal regulación de este comportamiento, analizamos el funcionamiento de los receptores de DA, D1 y D2 en el establecimiento de la hiperactividad locomotora de los ratones p35KO.

Los receptores D1 son cruciales en la regulación de la actividad locomotora, además, juegan un rol muy importante en los efectos crónicos y agudos de la administración de psicoestimulantes; debido a esto decidimos evaluar su funcionalidad en los ratones p35KO.

La actividad basal de los receptores D1 es necesaria para el mantenimiento de la actividad locomotora, y se ha citado que la inhibición farmacológica produce sedación en ratas y ratones (Meyer y *col.*, 1993). En este sentido, en primer lugar se administró una dosis de 0,05 mg/kg del antagonista de los receptores D1 SCH23390, dosis que produce disminución en la actividad locomotora en ratas y ratones sanos. Al administrar dicha dosis a ratones juveniles p35KO y WT, se observó una gran disminución de la actividad locomotora en ambos genotipos, los cuales además mostraron una cinética de los efectos del fármaco bastante similar. Por otro lado, se observó que el efecto de dicho tratamiento farmacológico fue mas pronunciado en los ratones p35KO donde éste produjo una caída en la actividad locomotora de 3,2 veces, mientras que en los ratones WT esta fue de alrededor de 2 veces. Está observación probablemente se deba a que los ratones p35KO al tener una actividad locomotora mayor, tienen un posible rango de variación en este comportamiento más amplio que los ratones WT, sin embargo, no puede descartarse de que esto pueda deberse a una distinta sensibilidad a dicho fármaco en los ratones p35KO. Sumado a esto, se observó que la actividad locomotora de los ratones p35KO tratados con SCH23390 alcanzó niveles similares a la de los ratones WT tratados con Sal, pero esta aún fue mayor que la de los ratones WT que recibieron la dosis del antagonista de D1. Estos resultados indican que, al menos en parte, la hiperactividad de los ratones p35KO estaría mediada por DA actuando en los receptores D1, ya que al bloquear estos receptores, ésta desaparece. La diferencia observada entre ratones p35KO y WT tratados ambos con el antagonista del receptor D1, podría sugerir la existencia de una contribución en la actividad locomotora no atribuible a dicho receptor, sin embargo al analizar la curva temporal de la acción del SCH23390, se observa que a partir de los 30 min del test la actividad de ambos genotipos es indistinguible, lo cual más probablemente señalaría que la diferencia observada en la actividad total durante los 60 minutos del test se deba a la mayor actividad locomotora observada en los primeros 20 minutos de éste y no a una diferencia en la magnitud del efecto de dicho fármaco.

Por otro lado, estos resultados indican que la señalización dopaminérgica basal a través de los receptores D1 no estaría mayormente afectada en los ratones p35KO, ya que la respuesta ante su bloqueo es similar a la encontrada en los ratones WT. Algunos autores interpretan que el uso de inhibidores de receptores D1 actuarían durante la actividad “tónica” de estos, ya que estarían inhibiendo la actividad su constitutiva en respuesta a los niveles basales de DA en la cavidad sináptica debida a la liberación espontánea de DA (Holmes y col., 2001; Napolitano y col., 2010), sin embargo, el bloqueo de estos receptores también estaría dejando sin sitio de acción a la DA liberada físicamente. En este sentido, el ratón p35KO no mostraría una actividad tónica alterada de estos receptores, lo cual estaría en concordancia con otros modelos de hiperactividad como los observados en ratones con genéticamente modificados con un DAT insensible a COC (DAT-CI) y ratones *coloboma* (hemizigotas para la proteína SNAP-25), en los cuales la misma dosis de SCH23390 que la utilizada por nosotros fue eficiente en reducir la actividad locomotora de estos animales (Fan y Hess, 2007; Napolitano y col., 2010). Además, en ratas SHR se encontró que la administración de SCH23390 produjo una atenuación de la hiperactividad motora característica de esta cepa (Ohno y col., 2012). En ratas NHE, se observó que dosis muy bajas de 0,01 mg/kg de SCH23390 produjo un aumento en la actividad locomotora en comparación con los animales control, mientras que dosis mayores produjeron sedación locomotora (Viggiano y col., 2003b), sin embargo, este mismo resultado fue encontrado en ratas de la cepa Long-Evans, las cuales no presentan hiperactividad (Meyer y col., 1993), indicando que este efecto diferencial a distintas dosis de antagonistas de D1 podría no estar relacionado con la hiperactividad encontrada en dicha cepa, además indicaría que la cepa elegida como control en esos estudios no sería la más adecuada.

Por otro lado, en ratones seleccionados por su hiperactividad en el “wheel-running” test se observó que si bien estos reducen su actividad locomotora en respuesta a COC o MTF (Rhodes y col., 2001; Rhodes y Garland, 2003), estos mostraron mucho menor sensibilidad a SCH23390 a tres dosis diferentes con respecto a los animales controles, indicando una diferencia en la sensibilidad de estos receptores o un rol diferente de estos en el establecimiento de la hiperactividad (Rhodes y Garland, 2003). Esto indicaría que en algunos casos la hiperactividad podría estar relacionada con alteraciones en la actividad tónica de los receptores D1. En nuestro caso, si bien el funcionamiento de los receptores D1 es crucial para

la expresión de la hiperactividad locomotora, la función de estos receptores no estaría afectada.

En contraposición a lo encontrado con la inhibición farmacológica de D1, la ablación genética de éste produce efectos opuestos a estos. Se ha citado, que ratones transgénicos carentes de D1 (D1-KO) presentan mayores niveles de actividad locomotora con respecto a los animales WT (Xu *y col.*, 1994; Centonze *y col.*, 2003), sin embargo otros trabajos no encuentran hiperactividad (Drago *y col.*, 1994; Drago *y col.*, 1996). Si bien estos animales podrían ser útiles para comprender el papel de D1 en el establecimiento de la actividad locomotora, es probable que este fenómeno este relacionado con mecanismos compensatorios por la falta de este receptor y no con la función natural de D1, además, dada la gran importancia de este, dichos ratones muestran gran cantidad de anomalías, como alta letalidad pre y perinatal, bajo peso y retrasos en el crecimiento relacionado con poca ingesta de alimentos y muerte prematura, entre otros (Drago *y col.*, 1994), por lo cual todas estas complicaciones agregarían demasiadas variables dificultando mucho la obtención e interpretación de los resultados.

A continuación evaluamos el estado de la señalización dopaminérgica mediada por los receptores D1 través de la utilización del agonista SKF81297. De acuerdo a algunos autores, esta estimulación farmacológica es útil para evaluar el componente fásico de la transmisión a través de D1, es decir la respuesta de estos receptores a la llegada de grandes cantidades de DA liberada por las neurona presinápticas. Típicamente, el tratamiento con agonistas de D1, incluido SKF81297, produce aumentos en la actividad locomotora de ratas y ratones sanos. En algunos casos también es frecuente encontrar una respuesta bifásica, con un ligera disminución de la locomoción inmediatamente después de la inyección de dichas sustancias, la cual dura muy poco tiempo, y luego da lugar a un gran aumento en la actividad locomotora, tipo de respuesta que es mas frecuente en ratas adolescentes o adultas y a dosis elevadas de este tipo de sustancias (Diaz Heijtz *y col.*, 2004; Diaz Heijtz y Castellanos, 2006).

Como se comentó en la sección Resultados, el tratamiento con SKF81297, produjo un gran aumento en la actividad locomotora en ratones WT (aproximadamente 350%) y un aumento mas leve (del 30%) en los ratones p35KO, con respecto a los animales tratados con Sal. Esta gran diferencia probablemente se deba a que los animales WT tienen un margen para aumentar su actividad locomotora mucho mayor que los animales p35KO, los cuales se

encontrarían mas cerca de un nivel techo para su actividad locomotora. Además, la actividad locomotora de los ratones p35KO tratados con el agonista de D1 fue estadísticamente mayor que la de los animales WT con el mismo tratamiento. El análisis de las curvas temporales indica que a partir del periodo 30 min, la actividad de los ratones p35KO tratados con SKF81297 es mayor que la de los animales tratados con Sal, y aproximadamente al tiempo 40 min los ratones tratados con SKF81297 alcanzan el nivel máximo de actividad locomotora presentados por estos ratones en este trabajo. Estas observaciones indicarían que el SKF81297 produce un aumento en la actividad locomotora de los ratones p35KO con respecto a los que recibieron Sal aumentando los niveles de locomoción en cada periodo y manteniendo a los ratones activos por mas tiempo. Además se observó que en los diferentes tiempos del test, la actividad locomotora de los ratones p35KO y WT ambos tratados con SKF81297 fue estadísticamente indistinguible, aunque los valores de los animales WT estuvieron siempre por debajo de los de los p35KO, esto indicaría que el efecto de dicho fármaco, seria en magnitud similar entre los genotipos. Teniendo en cuenta esta última afirmación, la diferencia detectada en el tiempo total del test se debería a la suma de los pequeños efectos observados en los diferentes tiempos del test.

En conjunto, estos resultados indicarían que el componente fásico de la señalización a través de D1 no se encontraría afectado en los ratones p35KO, ya que estos pueden responder aumentando su actividad locomotora en respuesta a una estimulación de dichos receptores. Por otro lado, estos resultados también indicarían que la hiperactividad observada en los ratones p35KO no sería un consecuencia de una anormal señalización de los receptores D1, sino que probablemente este relacionada con los niveles de DA y su regulación en la presinápsis. Además, estos resultados darían indicios acerca del mecanismo a través del cual ANF y MTF producirían sus efectos sedativos en los ratones deficientes en p35. Probablemente, estos psicoestimulantes no ejercerían sus efectos aumentando los niveles totales de DA y su consecuente señalización, ya que como observamos con el uso de SKF81297, la mayor estimulación de los receptores D1 produce aumentos y no disminución en la actividad locomotora en el ratón p35KO, por lo que sería mas probable que ANF y MTF ejerzan sus efectos a través de la regulación de los niveles de DA mediante mecanismos presinápticos (los cuales se discutirán mas adelante).

Este resultado es similar al exhibido en otros animales hiperactivos en los que el uso de agonistas de D1 también producen aumentos en la actividad locomotora. En ratas SHR, tres dosis diferentes de SKF81297 (0,3; 3,0 y 1,0 mg/kg) producen aumentos en la actividad locomotora de estas, manteniéndose elevada al menos durante 60 min, al igual que en los animales control; además, encuentran un efecto bifásico de este fármaco con la dosis mayor (10,0 mg/kg) en los primeros 20 min del test (Diaz Heijtz y Castellanos, 2006). Por otro lado, ratones transgénicos que expresan solo un 10% de los niveles de DAT (DAT *knock-down*, DAT-KD), los cuales presentan hiperactividad locomotora reversible con ANF, dos dosis diferentes de SKF81297 (2,0 y 8,0 mg/kg), producen un aumento en la actividad locomotora de estos ratones al igual que en los WT, sin embargo, este aumento es proporcionalmente menor en los animales DAT-KD a la dosis mas baja, e incluso menor en niveles totales a la dosis mayor (Zhuang y col., 2001). El resultado observado con la dosis de 2,0 mg/kg es similar al obtenido por nosotros en los ratones p35KO en donde el aumento en la actividad locomotora inducido por SKF81297 es menor en proporción al de los ratones WT.

Un resultado interesante es el encontrado en ratones transgénicos carentes de DA (DA^{-/-}); estos animales durante la adultez necesitan de la administración de l-DOPA, sin la cual estos se vuelven hipoactivos, dejan de alimentarse y mueren. En estos ratones, el tratamiento con una dosis de 50 mg/kg de l-DOPA, la cual restablece los niveles de DA en un 9% con respecto a los animales WT, produce un gran aumento de la actividad locomotora, sin afectar la de los ratones WT. Además, el agonista SKF81297 produce un aumento en la actividad locomotora mucho mayor en los ratones DA^{-/-} que en los ratones WT, acompañado por un mayor afinidad de los receptores D1 por el ligando [³H]-SCH23390 y por el ligando de D2 [³H]-spiperona. Estos datos indicarían que la falta de DA produciría un estado de hipersensibilidad de D1 y D2, señalando que los niveles normales de este neurotransmisor serían cruciales para la correcta función de sus receptores (Kim y col., 2000). Este resultado se complementaría con lo observado en los ratones DAT-KD, los cuales presentan un aumento de aproximadamente un 70% de DA extracelular con respecto a los controles, en los cuales los autores de este trabajo sugieren que la menor sensibilidad de los receptores D1 a los efectos estimulantes del SKF81297 estarían relacionados con este mayor tono dopaminérgico (Zhuang y col., 2001).

En ratas NHE, los efectos del uso de SKF81297 no se han probado de forma concluyente, solo se ha demostrado que dosis muy bajas (de 0,1 mg/kg) producen el mismo efecto en estas ratas y en su cepa control (Viggiano *y col.*, 2003b).

Por otro lado, en ratones DAT-CI, el tratamiento con 5 mg/kg de SKF81297 produjo una gran reducción de la actividad locomotora; fenómeno que los autores atribuyen a una señalización aberrante por parte de D1. Esta afirmación es apoyada por la observación de que en estos ratones la activación de D1 por SKF81297 o ANF, no induce la fosforilación de sustratos de PKA (Napolitano *y col.*, 2010). Los autores de este trabajo sugieren que esta desregulación en la señalización de receptores D1 sería una consecuencia del mayor tono dopaminérgico encontrado en estos ratones, los cuales presentan un aumento del 65% en los niveles de DA extracelular (Chen *y col.*, 2006; Napolitano *y col.*, 2010). Esta interpretación entraría en conflicto con lo observado en los ratones DAT-KD, los cuales presentan una elevación similar en los niveles de DA extracelular, pero en estos, SKF81297 no produce efectos sedativos sino estimulantes, pero en menor medida que los ratones WT. Los ratones DAT-CI y DAT-KD son muy similares en muchos aspectos, como la hiperactividad, respuesta a psicoestimulantes y niveles extracelulares de DA, sin embargo, la integración de su señalización a través de los receptores D1 es muy diferente, y en ambos casos los autores atribuyen a resultados opuestos la misma causa; esto pone en evidencia la complejidad de los resultados obtenidos al trabajar con ratones transgénicos, ya que es muy difícil evaluar las consecuencias que la modificación de la función de un gen puede tener durante el desarrollo del animal.

Cabe destacar que efectos sedativos en respuesta a la administración de SKF81297 también se han encontrado en ratones transgénicos que sobreexpresan el receptor D1, pero estos ratones no presentan hiperactividad (Dracheva *y col.*, 1999; Dracheva y Haroutunian, 2001) Aparte de estos animales, encontrar en la bibliografía ejemplos de disminución de la actividad locomotora en respuesta a agonistas completos de D1 es muy poco frecuente.

Algunos autores sugieren que la magnitud (o incluso la dirección) de los efectos producidos por la administración de agonistas completos de D1 como SKF81297 dependería de los niveles de actividad locomotora basal del animal (Diaz Heijtz y Castellanos, 2006), sin embargo, un trabajo que compara el efecto de distintas dosis del agonista de D1, R-6-Br-APB, en cuatro diferentes cepas de ratones (Swiss-Webster, 129X1/SvJ, C57BL/6J y DBA/2J) con

distintos niveles de actividad locomotora en el campo abierto, indica, que la actividad basal de estas, no puede predecir la sensibilidad ni la magnitud de la respuesta a las diferentes dosis de dicho agonista (Ralph y Caine, 2005).

Cabe destacar, que si bien en la bibliografía se habla de fármacos que actúan selectivamente como agonistas o antagonistas de receptores D1, la realidad es que debido a su gran similitud estructural, los receptores D1 y D5 tienen características farmacológicas prácticamente indistinguibles (Missale y col., 1998), por lo que los agonistas específicos para alguno de estos subtipos de receptores deben ser considerados más correctamente como agentes selectivos de receptores tipo D1 (es decir D1/D5). Los receptores D5 tienen una distribución anatómica mucho más restringida que los receptores D1; en áreas en que su expresión coincide con D1, como Str y Cpf se encuentran restringidos a interneuronas colinérgicas, sin embargo, una pequeña subpoblación de NSM del Str coexpresan tanto receptores D1 como D5 (Nicola y col., 2000; Wu y col., 2012). Los receptores D5 participan en la regulación de los ritmos circadianos, en conductas sexuales y en el control a nivel central de la presión arterial (Viggiano y col., 2003a). Los animales transgénicos tanto para D1 como para D5, indican que la participación de los receptores D5 en la regulación de la actividad locomotora sería muy reducida y que estos principalmente actuarían de forma sinérgica con los receptores D1 (Holmes y col., 2001; Centonze y col., 2003). Debido a esto se asume, en la mayoría de los trabajos, que los efectos en la actividad locomotora de fármacos agonistas o antagonistas de receptores D1/D5 son mediados casi exclusivamente por los receptores D1. Teniendo en cuenta esto, pensamos que en el ratón p35KO los efectos tanto de SCH23390 y SKF81297 son mediados a través de D1, sin embargo, no podemos descartar que D5 pueda estar participando de alguna manera en los efectos de estos fármacos.

A continuación se estudió la funcionalidad de los receptores D2 en el ratón p35KO, debido a que estos, son cruciales en la regulación de actividad locomotora (Missale y col., 1998). La participación de los receptores D2 en la modulación de actividad locomotora es compleja y comprende receptores ubicados tanto en la pre como en la postsinapsis (De Mei y col., 2009; Wu y col., 2012). En la presinapsis, D2 modula negativamente la liberación de DA mediante un mecanismo de retroalimentación negativa (Benoit-Marand y col., 2001). En la postsinapsis, en NSM del Str, D2 antagoniza las funciones de D1, especialmente en neuronas que co-expresan ambos receptores, regulando negativamente la actividad locomotora, sin

embargo, el bloqueo de los receptores D2 postsinápticos produce una inhibición de la actividad locomotora (Mercuri y col., 1997; Rouge-Pont y col., 2002). Teniendo en cuenta esto, el uso de agonistas o antagonistas de receptores D2, pueden tener el mismo efecto neto, es decir bloquear la actividad locomotora, por lo que la interpretación de los resultados obtenidos mediante este tipo de fármacos suele ser más confusa que los esperados para drogas que afectan a los receptores D1.

En primer lugar para estudiar la función de los receptores D2 en los ratones p35KO se utilizó una dosis de 0,5 mg/kg del agonista QNP, el cual en ratones produce rápidamente una inhibición de la actividad locomotora. Tanto en ratones p35KO como WT, dicha dosis produjo una marcada y rápida disminución de la actividad locomotora, siendo esta más marcada en los animales p35KO que en los WT. Además, la actividad locomotora luego de dicho tratamiento fue indistinguible entre ratones p35KO y WT, aunque se observó una tendencia a ser mayor en los animales transgénicos ($p=0,06$). Por otro lado, se observó que la cinética de acción del QNP fue equivalente en todos los tiempos entre los ratones p35KO y WT. Asimismo, se detectó que en valores absolutos, la actividad locomotora de los ratones p35KO tratados con dicho agonista, alcanzó niveles de actividad locomotora menores al de los ratones WT tratados con Sal. Estos datos, indicarían que, al menos bajo estos parámetros, la función de los receptores D2 sería equivalente entre los ratones p35KO y WT.

Si bien QNP puede actuar tanto en neuronas pre y postsinápticas, algunos datos indican que éste ejercería sus efectos sedativos en ratones principalmente inhibiendo la liberación de DA en la presinapsis, aunque el aumento en la activación de los receptores D2 postsinápticos también podría contribuir a su acción. Esta interpretación es apoyada por el hecho de que se ha observado de que QNP inhibe la liberación de DA tanto *in vitro*, como *in vivo*, y que en ratones que carecen de D2 este fármaco no afecta la liberación de DA (Bello y col., 2011) . Además, se ha observado que ratones transgénicos que carecen de receptores D2 presinápticos, el tratamiento con diferentes dosis de QNP, solo produce una ligera disminución en la actividad locomotora, la cual es atribuible a los receptores postsinápticos (Zhuang y col., 2001; Fan y Hess, 2007; Napolitano y col., 2010), confirmando que el principal mecanismo de acción de este fármaco es a través de los receptores ubicados en la presinapsis. Estas observaciones nos permitirían sugerir que los autoreceptores D2 del ratón p35KO funcionarían correctamente. Este resultado es similar a lo observado en otros ratones

hiperactivos propuestos como modelos de TDAH, como los ratones *coloboma*, DAT-KD y DAT-CI, en los cuales diferentes dosis de QNP, producen una atenuación de la actividad locomotora similar a la producida en los animales control (Jones y *col.*, 1999). A diferencia de estos, en los ratones DAT-KO se ha encontrado una pérdida de función de los autoreceptores D2 evidenciado por técnicas bioquímicas y electrofisiológicas (Bello y *col.*, 2011), sin embargo, el efecto de agonistas de D2 en la actividad locomotora de estos ratones no ha sido evaluado. Esta pérdida de función de los autoreceptores estaría relacionada con las alteraciones en los niveles de DA en los ratones DAT-KO y sería una característica particular de este ratón que no es compartida con ningún otro modelo de TDAH. Por otro lado, cabe destacar que ratones que carecen de receptores D2 presinápticos, los cuales también son hiperactivos, el tratamiento con QNP produce una leve disminución (pero significativa) de la actividad locomotora indicando que los receptores D2 postsinápticos también contribuirían, aunque en menor medida, a los efectos sedativos de los agonistas de D2 (Van Hartesveldt y *col.*, 1994; Ralph y Caine, 2005; Langen y Dost, 2011).

Al comparar este último resultado, con respecto a lo observado en ratas, surge la dificultad de que en esta especie, a diferencia de lo que ocurre en ratones, la administración de agonistas de receptores D2, como QNP o quinolorane producen aumentos en la actividad locomotora (Langen y Dost, 2011). Aun así, teniendo en cuenta esta salvedad, se ha observado que la administración de este tipo de fármacos produce el mismo efecto en ratas que difieren en su patrón de actividad locomotora, como ratas SHR, NHE, WKY y Wistar, indicando que al menos a grandes rasgos, la función de los receptores D2 no se encontraría muy afectada en estos animales, al menos con respecto a su modulación en la actividad locomotora (Dias y *col.*, 2012).

Luego de confirmar mediante el uso de QNP que los receptores D2 son funcionales y conservan la habilidad de inhibir la actividad locomotora, evaluamos el efecto de la inhibición de estos mediante la utilización del antagonista HAL. Se ha observado que HAL puede producir dos tipos de efectos opuestos en la actividad locomotora de acuerdo a las dosis en las que se administre, a dosis muy bajas produce un aumento en la actividad locomotora, mientras que a dosis mayores sus efectos son sedativos. Esto se debe a que los receptores pre y postsinápticos presentan diferente afinidad por dicho agonista (Carey y *col.*, 2008). Los receptores presinápticos tienen mayor afinidad que los postsinápticos, por lo que

a dosis muy bajas, HAL solo actuaría en los primeros (Lidsky y Banerjee, 1993). El HAL, al unirse a los autoreceptores D2, bloquea el tono inhibitorio ejercido por estos sobre la liberación de DA, produciendo un aumento en la liberación de este neurotransmisor, con el consecuente aumento en la actividad locomotora (Jones y *col.*, 1999; Morice y *col.*, 2007). A dosis mayores, HAL puede unirse a los receptores D2 postsinápticos, inhibiendo su función, la cual, como se comentó previamente es necesaria para la expresión de la actividad locomotora. Teniendo en cuenta estas premisas, se utilizaron dos dosis diferentes, una baja (0,03 mg/kg) y una moderada (0,1 mg/kg) de HAL con el fin de evaluar el efecto del bloqueo de la función de los receptores D2 pre y postsinápticos en la expresión de la actividad locomotora de los ratones p35KO.

Al administrar la dosis mayor de HAL (0,1 mg/kg) observamos una disminución de la actividad locomotora en ambos genotipos, aunque más marcada en los ratones p35KO, en los cuales el tratamiento con HAL produjo una disminución de aproximadamente un 58% en la actividad locomotora con respecto a los tratados con Sal, mientras que la misma comparación en los animales WT indicó una disminución de aproximadamente un 42%. Cabe destacar que en los ratones WT, esta disminución no fue estadísticamente diferente pero si estuvo cerca de alcanzar dicho nivel ($p=0,059$). Estos datos indicarían que los receptores D2 postsinápticos son mucho más sensibles a los efectos de dicha dosis de HAL. En la literatura, la dosis elegida de HAL produce disminución en la actividad locomotora en ratones sanos, sin embargo, en nuestros ratones WT, esta no alcanza la significancia estadística. Esta falta de diferencias significativas observadas en el ratón WT probablemente esté más relacionada con la metodología estadística elegida que con una falta de respuesta a dicha dosis de HAL; esto probablemente se debería a la forma que utiliza el test a posteriori elegido en computar las varianzas de cada factor y probablemente con solo aumentar el n de dicho experimento este valor hubiese sido significativo; además si evaluamos a cada genotipo por separado mediante un ANOVA de una vía, encontramos diferencias significativas entre los ratones WT tratados con HAL y Sal ($F(1,15)=6,223$, $p=0,025$). Por otro lado, se observó que si bien la magnitud del efecto del HAL fue mayor en los animales p35KO, la actividad locomotora de estos fue mayor que la de los ratones WT. Esto también se observó al analizar la curva temporal en la que en periodos de tiempo ,comprendidos entre los min 10, 20 y 30 fue significativamente mayor (en el min 40 estuvo cerca de la significancia estadística) que la de los ratones WT, indicando

que a dicha dosis HAL no puede reducir la actividad a los mismos niveles que lo hace en los ratones WT. Esta última observación es diferente a lo observado con los tratamientos con SCH23390 o QNP, en donde la inhibición de la actividad locomotora luego de los dichos tratamientos farmacológicos es similar en ambos genotipos.

El tratamiento con la dosis mas baja de HAL (0,03 mg/kg) produjo, como era de esperar de acuerdo a lo encontrado en la bibliografía, un leve aumento, aunque plenamente significativo de la actividad locomotora en los ratones WT comparado con los tratados con Sal. Por otro lado, en los ratones p35KO, dicha dosis de HAL produjo una disminución de aproximadamente un 60% en los niveles de actividad locomotora con respecto a los ratones que recibieron Sal.

En la curva temporal se observó en los ratones p35KO tratados con 0,03 mg/kg de HAL un patrón similar al observado con la dosis mayor del mismo fármaco, es decir una marcada disminución de la actividad locomotora evidente a partir del primer periodo de tiempo y que se mantiene a lo largo del test con respecto a los animales del mismo genotipo pero tratados con Sal. Por otro lado, en los animales WT, si bien estos disminuyen su actividad a medida que progresa el tiempo del test, la actividad locomotora de estos, excepto en el periodo inicial (y en el tiempo 50 min), es siempre mayor que la de los animal tratados con Sal del mismo genotipo, indicando que el aumento observado en la actividad locomotora total de estos animales se debe a un efecto sostenido de dicho agonista a lo largo de la duración del test.

Los resultados obtenidos luego de la dosis de 0,1 mg/kg de HAL, indican que el funcionamiento de los receptores D2 postsinápticos de las ratones p35KO sería equivalente al de los ratones WT. Diversas evidencias indican que el mecanismo de acción del HAL mediante el cual produce sus efectos sedativos son mediados por los receptores D2 postsinápticos. Por ejemplo, en ratones DAT-KO los cuales presentan una pérdida de función de los receptores D2 presinápticos, 0,075 mg/kg de HAL induce una marcada reducción en la actividad locomotora (Bello y *col.*, 2011); además, los ratones que carecen de receptores D2 presinápticos responden de manera similar a dosis sedativas que los animales WT (Wang y *col.*, 2000); estos datos indican que la función de los receptores D2 presináptica no es necesaria para que el HAL produzca sus efectos sedativos. Por otro lado, ratones transgénicos que carecen de la isoforma D2I del receptor D2, la cual se expresa

principalmente en neuronas postsinápticas y es la isoforma predominante en dichas neuronas, presentan una sensibilidad mucho menor a los efectos sedativos del HAL (Uziel y col., 2000; Wang y col., 2000), además estos ratones no presentan catalepsia inducida por este fármaco en test específicos para este fenómeno (Xu y col., 2002) ; por otro lado, también se ha observado que estos ratones presentan menor respuesta a los efectos sedativos al antagonista de D2, raclopride (Fan y col., 2010; Napolitano y col., 2010), indicando la importancia de los receptores postsinápticos en la sedación inducida por este tipo de fármacos.

El efecto sedativo a dosis moderadas de HAL encontrados por nosotros en los ratones p35KO es similar a lo descrito en otros animales hiperactivos y/o propuestos como modelos de TDAH. Además de los ratones DAT-KO y de los que carecen de autoreceptores D2, la inhibición a dosis moderadas de HAL puede encontrarse también en ratones DAT-CI y ratones *coloboma* (Yen y col., 2013). Este tipo de respuesta al HAL está presente en una cepa de ratones hiperactivos (reversibles con ANF), los cuales fueron seleccionados de acuerdo a sus bajos niveles de ansiedad (Rhodes y Garland, 2003); además, en ratones seleccionados por sus altos niveles de actividad en el “wheel-running test”, no se encontraron diferencias entre estos y los animales control cuando fueron tratados con el antagonista de receptores D2 raclopride (Mohn y col., 1999; Wiedholz y col., 2008). Observaciones similares se han realizado en animales con alteraciones en componentes del sistema glutamatérgico, como ratones KO para el receptor GluR1 o con niveles reducidos del receptor AMPA; estos animales presentan altos niveles de hiperactividad la cual es revertida mediante el uso de HAL, sin embargo otras características de estos, los sitúan mejor como modelos de esquizofrenia que de TDAH (Kuwagata y col., 2004).

Por otro lado, se ha observado que en algunos animales hiperactivos, el tratamiento con antagonistas de D2 produce aumento de la actividad locomotora mientras que las mismas dosis inducen sedación en los animales control. Esto se ha observado en ratas tratadas prenatalmente con 5-bromo-deoxiuridina, una neurotoxina, en los cuales la administración con sulpiride produce un aumento en la actividad locomotora de estos animales mientras que en los animales control produce sedación (Lee y col., 2002). Observaciones similares se han obtenido en ratones transgénicos carentes de la enzima adenilil ciclasa 5; en los cuales la administración de dosis moderadas de HAL produce

aumentos en la actividad locomotora (Ardayfio y *col.*, 2010). Además, en ratones genéticamente modificados carentes del gen homeótico Pitx3, crucial para el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas, lo que produce ratones que presentan afagia e hiperactividad reversible con ANF, el tratamiento con 1,0 mg/kg de HAL no es efectivo en producir catalepsia (Van den Buuse y *col.*, 1992; Russell y *col.*, 1995). Finalmente en ratas SHR, se observó que sulpiride a diferentes dosis, puede producir aumentos en la actividad locomotora, pero no disminución, efecto que si produce en ratas WKY, sin embargo, el efecto producido por este fármaco en la liberación de DA es similar entre las ratas de las dos diferentes cepas (Wang y *col.*, 2000; Lee y *col.*, 2002; Ardayfio y *col.*, 2010), lo que indicaría que el efecto diferencial encontrado luego de dicho tratamiento estaría relacionado con alteraciones en las neuronas postsinápticas y no presinápticas.

De acuerdo a estos datos, la respuesta observada a la dosis mayor de HAL en los ratones p35KO es similar a lo reportado más frecuentemente en animales hiperactivos. Por otro lado como se comentó previamente las evidencias indican que los efectos sedativos de fármacos de este tipo son mediados casi exclusivamente por los receptores postsinápticos. En los animales menos sensibles a los efectos sedativos de antagonistas de D2 como los ratones D2I-KO o en animales que responden de manera opuesta a estos tratamientos, como los ratones con mutaciones en el gen Pitx3 o carentes de adenilil ciclasa 5, se ha demostrado alteraciones en la transmisión postsináptica mediada por receptores D2 (Lidsky y Banerjee, 1993; Garris y *col.*, 2003).

Estos datos en conjunto nos indicarían que el funcionamiento de los receptores D2 postsinápticos sería normal en los ratones p35KO ya que el bloqueo de estos a la misma dosis de HAL utilizada en los ratones WT produce una marcada disminución en la actividad locomotora. Sin embargo, cuando se utilizó la dosis menor de HAL, el efecto observado entre ratones p35KO y WT fue el opuesto, en ratones p35KO produjo sedación mientras que en los WT estimulación. Este efecto bifásico a diferentes dosis de HAL, como el observado en los ratones WT es posible debido a los efectos opuestos que este puede producir en los receptores pre y postsinápticos, y a las diferencias en la afinidad de estos receptores por este tipo de sustancias. EL HAL tiene la capacidad de aumentar la liberación de DA en un rango muy amplio de dosis, al bloquear el control negativo que los autoreceptores producen sobre la liberación de este neurotransmisor (Chergui y *col.*, 2004), pero debido a que la función de

los receptores D2 postsinápticos es necesaria para el mantenimiento de la actividad locomotora, HAL, puede producir sedación al bloquear estos últimos independientemente de los niveles de DA extracelular. Sin embargo, la afinidad de los receptores D2 presinápticos es menor que la de los postsinápticos, por lo que dosis muy bajas pueden producir aumentos en los niveles de DA extracelular sin inhibir a los receptores D2 postsinápticos. Este fenómeno es el que estaría sucediendo en los ratones WT luego del tratamiento con 0,03 mg/kg de HAL. Por otro lado, en los ratones p35KO esta dosis muy baja no solo no produce activación, sino que produce disminución en la actividad locomotora. Esto podría deberse a diferentes causas, en primer lugar HAL produce aumentos en los niveles extracelulares de DA al bloquear los receptores D2 que se encuentran activos, ejerciendo su control inhibitorio; si este tono inhibitorio se encontrara tónicamente disminuido en los ratones p35KO, el HAL no tendría margen para actuar sobre éste, por lo cual no podría aumentar la liberación de DA. Además, esta posible disminución en la actividad basal de actividad de los autoreceptores D2 podría ser útil para explicar el mecanismo mediante el cual ANF y MTF producirían sus efectos sedativos en los ratones p35KO (ver mas adelante). Por otro lado esta falta de efectos estimulantes del HAL podría esta relacionada con una pérdida de la función de los autoreceptores, sin embargo mediante el uso de QNP, previamente demostramos que los receptores D2 son funcionales y pueden ejercer sus tono inhibitorio al ser estimulados. Si bien esta hipótesis proveería una explicación sobre la falta de efectos estimulantes, no explicaría la disminución observada luego de la dosis de 0,03 mg/kg de HAL, ya que este efecto debería ser mediado por los receptores D2 postsinápticos. Lo observado en los animales WT indicaría que la dosis de 0,03 mg/kg de HAL estaría por debajo del umbral de inhibición de los receptores postsinápticos, sin embargo dicha dosis produce sedación en los ratones p35KO, lo que indicaría que estos receptores podrían encontrarse en un estado supersensibilizado en estos ratones. Una mayor afinidad en estos receptores podría explicar los efectos sedativos de dicha dosis de HAL en los ratones p35KO independientemente de lo que ocurriese en la presinápsis, sin embargo estas dos hipótesis no serían excluyentes una de otras, sino que podrían estar sucediendo simultáneamente.

Consideraciones finales:

El conjunto de resultados obtenidos en este trabajo de tesis nos permiten sugerir por primera vez que la disfunción del complejo CDK5/p35 produce una serie de alteraciones que culminan con el establecimiento de un fenotipo hiperactivo, reversible mediante el uso de psicoestimulantes, con ausencia de comportamientos tipo-ansiedad y con desregulaciones en la transmisión sináptica dopaminérgica.

Las evidencias obtenidas nos permiten pensar que el desarrollo de la hiperactividad en el ratón p35KO está relacionado con alteraciones en la homeostasis dopaminérgica. En primer lugar, es conocido que altos niveles de actividad locomotora pueden relacionarse con alteraciones en la maquinaria sináptica dopaminérgica. Además, nosotros observamos que el uso de fármacos que actúan principalmente modificando los niveles de DA en la cavidad sináptica producen una marcada reducción en los niveles de locomoción en nuestros ratones transgénicos. Por otro lado, hemos demostrado la existencia de alteraciones funcionales en la síntesis y en el metabolismo de DA en ratones p35KO juveniles, representado por mayores niveles de la enzima TH y por mayores niveles de L-DOPA y DA, pero con una menor tasa DOPAC/DA. De manera interesante, el tratamiento con psicoestimulantes, no solo ocasionó una reversión del fenotipo hiperactivo de los ratones p35KO, sino también, produjo una normalización en los parámetros dopaminérgicos previamente mencionados.

Si bien, en los ratones p35KO hemos observado un incremento en los niveles totales de DA, la tasa de utilización de ésta (DOPAC/DA) es menor que la presentada por los ratones WT, lo cual podría estar indicando, entre otros fenómenos, una menor cantidad de DA en la cavidad sináptica proveniente de la liberación tónica. Esta menor cantidad basal de DA, produciría una menor activación de los receptores D2 presinápticos, lo que resultaría en una mayor liberación fásica de DA que estaría relacionada con el establecimiento de la hiperactividad en el ratón p35KO.

Curiosamente, en ratones p35KO adultos, en los cuales la hiperactividad locomotora desaparece, también se observó una normalización en los niveles de TH, de DA y en la tasa de utilización DOPAC/DA.

Estos datos señalan claramente que DA podría estar altamente relacionado con la hiperactividad encontrada en el ratón p35KO ya que hemos demostrado que al normalizarse ciertos parámetros dopaminérgicos, ya sea mediante el uso de psicoestimulantes o por el normal desarrollo del ratón al llegar a la edad adulta, la hiperactividad desaparece.

Además, apoyando esta hipótesis dopaminérgica, es sabido que CDK5 juega un rol crucial en la regulación de este neurotransmisor. En la presinapsis, además de sus efectos en la función y estabilidad de TH, CDK5 regula negativamente la liberación sináptica de DA evocada por la estimulación de las fibras que provienen desde VTA y Snc (Bibb *y col.*, 1999), fenómeno que podría estar afectado en nuestro ratón transgénico. Este aumento en la liberación evocada de DA, es decir la liberación dependiente de la llegada de potenciales de acción, contribuiría al establecimiento de la hiperactividad del ratón p35KO.

Por otro lado, CDK5 regula negativamente la neurotransmisión postsináptica a través de D1, fosforilando a DARPP-32 en la Tre75, lo que convierte a ésta en un potente inhibidor de PKA, uno de los efectores primarios de la vía de señalización mediada por estos receptores (Nishi *y col.*, 1997; Nishi *y col.*, 2000). De hecho, en condiciones basales, PKA se encuentra tónicamente inhibida por DARPP-32_{pTre75}, y la desfosforilación de la Tre75 resulta en una desinhibición de PKA y la amplificación de la vía D1/PKA/DARPP-32_{pTre34} (Bibb *y col.*, 1999). De acuerdo con estos trabajos, los ratones p35KO presentan una disminución de un 75% en los niveles de DARPP-32_{pTre75}, y una mayor actividad de PKA en respuesta a la estimulación de D1, indicando una desinhibición de la vía de señalización D1/PKA, lo cual podría estar relacionada con el fenotipo hiperactivo encontrado en este ratón. De acuerdo con esto, se ha observado que una desinhibición de la función de los receptores D1 en NSM del Str, acompañado con un aumento en los niveles de fosforilación de DARPP-32_{pTre34}, como consecuencia de la delección de CK2, produce hiperactividad, apoyando la hipótesis de que una desinhibición en la vía de señalización de los receptores D1 puede producir hiperactividad (Rebholz *y col.*, 2013). Además, como se comentó anteriormente, esta facilitación en la señalización de los receptores D1 produce falta de comportamientos tipo-ansiedad, similar a lo observado por nosotros, indicando la existencia de mecanismos en común entre los ratones p35KO y los mutantes para CK2 en el establecimiento de hiperactividad y la falta de respuestas ansiosas.

Esta alteración en la homeostasis dopaminérgica, como consecuencia de la disfunción del complejo CDK5/p35 podría proveer información acerca del modo en que ANF y MTF producirían sus efectos sedativos en los ratones p35KO. El modelo clásico de acción de los psicoestimulantes es mediante un aumento en los niveles de DA extracelular, sin embargo, los resultados obtenidos por nosotros no parecen apoyar a este mecanismo como el responsable de los efectos de estos fármacos en los ratones p35KO. Esta afirmación se basa en que si los efectos sedativos de ANF y MTF serían sólo la consecuencia de una mayor cantidad de DA en la cavidad sináptica actuando en los receptores D1, éste resultado podría haber sido recreado mediante la estimulación directa de estos receptores, sin embargo, al tratar a los ratones p35KO con el agonista SKF81297 no encontramos dicho efecto sino que éstos respondieron aumentando aún más su actividad locomotora. Este resultado indicaría que ANF y MTF producirían sus efectos sedativos corrigiendo los niveles de DA y no a través de un aumento de estos en la cavidad sináptica.

Por otra parte, Grace (2000), ha propuesto un mecanismo mediante el cual ANF y otros psicoestimulantes producen sus efectos sedativos, en el cual la función de estos fármacos es aumentar los niveles tónicos de DA en la cavidad sináptica, aumentando así el control inhibitorio que los autoreceptores D2 ejercen sobre la liberación fásica de DA (Grace, 2000). Diversos elementos nos permiten pensar que este sería el mecanismo mediante el cual ANF y MTF ejercen sus efectos en el ratón p35KO. En primer lugar, como se mencionó anteriormente, los niveles de DOPAC/DA en el ratón p35KO serían consistentes con una reducción en los niveles extracelulares de DA; además, la administración de la dosis menor de HAL parece indicar que la función de los autoreceptores D2 se encontraría basalmente disminuida, consistente con una posible disminución en los niveles de DA presentes en la cavidad sináptica. Por otro lado, la administración de ANF y MTF, producen solo un ligero aumento en la tasa DOPAC/DA lo que se correspondería más con un aumento leve en la cantidad de DA que con una liberación exacerbada de esta; sin embargo, la posible inhibición de MAO por parte de ANF podría estar influyendo en esta observación. Finalmente, como ya se comentó, la falta de actividad de CDK5 aumenta la liberación fásica de DA, mediante exocitosis de las vesículas sinápticas, provocada por los potenciales de acción y la entrada de Ca^{2+} (Chergui y *col.*, 2004), el cual es precisamente el mecanismo que es inhibido por los

autoreceptores D2. Esto indicaría que ANF y MTF actuando vía DA/D2, podrían corregir una de las consecuencias funcionales producida por la ausencia de p35.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos durante esta tesis, nos permiten demostrar la existencia de una relación entre la alteración en la función del complejo CDK5/p35 y el establecimiento de un perfil conductual, bioquímico y farmacológico en el ratón p35KO que recrea y modela características claves del TDAH.

Estas observaciones están de acuerdo con la hipótesis central de esta tesis y con los objetivos planteados en la misma.

Entre los aportes de este trabajo, podemos señalar que al momento de publicar parte de los resultados aquí expuestos (Krapacher y *col.*, 2010), no existía en la literatura mención alguna acerca de la posible relación entre CDK5 y el TDAH, siendo nuestro trabajo el primero en proponer esta asociación, confirmada luego por otro grupo de investigación (Sagvolden y *col.*, 2005b).

Por otro lado, consideramos que debido a las características observadas en el ratón p35KO, este representa un modelo válido y sumamente interesante para el estudio del TDAH. Para que un modelo animal de una patología sea considerado válido, éste debe cumplir con una serie de criterios. En primer lugar debe recrear las manifestaciones clínicas del trastorno que se desea modelar, es decir debe tener una validez *per se* o de facto. Por otro lado, el modelo debe tener una base teórica relacionada con dicho trastorno, es decir el constructo teórico debe ser válido. Finalmente, dicho modelo debe poder predecir características desconocidas de dicha patología, es decir, debe tener una validez predictiva .

Con estas premisas en mente, consideramos que el ratón p35KO cumple con todos estos criterios. En primer lugar, el ratón recrea características claves del TDAH, como hiperactividad espontánea reversible con psicoestimulantes y deficiencias en el LCE, indicando que éste modelo tiene una fuerte validez *per se*. Sumado a esto, el ratón p35KO tiene una relación teórica muy sólida con el TDAH ya que CDK5 es un regulador esencial de la señalización dopaminérgica, sistema de neurotransmisión clave en la neurobiología de este desorden; además, hemos demostrado que alteraciones en la homeostasis dopaminérgica están relacionadas con el establecimiento del fenotipo hiperactivo de este ratón. Esto señala

que la relación entre CDK5/p35 y TDAH tendría una base teórica biológica muy fuerte, lo cual le proporciona validez a este constructo.

Finalmente, el hecho de que el ratón p35KO responda de manera paradójica a los psicoestimulantes y responda de manera similar a agonistas y antagonistas dopaminérgicos como otros modelos de TDAH, nos indica que nuestro ratón puede predecir características previamente no probadas en estos, lo cual es un indicador de la fiabilidad del modelo y además representa una herramienta muy útil a la hora de proponer nuevos experimentos e hipótesis especialmente relacionados con el uso de nuevos fármacos para el tratamiento de este desorden neurobiológico.

BIBLIOGRAFIA

- Advokat C (2010) What are the cognitive effects of stimulant medications? Emphasis on adults with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *Neurosci Biobehav Rev* 34:1256-1266.
- Ahlijanian MK, Barrezueta NX, Williams RD, Jakowski A, Kowsz KP, McCarthy S, Coskran T, Carlo A, Seymour PA, Burkhardt JE, Nelson RB, McNeish JD (2000) Hyperphosphorylated tau and neurofilament and cytoskeletal disruptions in mice overexpressing human p25, an activator of cdk5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:2910-2915.
- Antrop I, Stock P, Verte S, Wiersema JR, Baeyens D, Roeyers H (2006) ADHD and delay aversion: the influence of non-temporal stimulation on choice for delayed rewards. *J Child Psychol Psychiatry* 47:1152-1158.
- Antshel KM, Hargrave TM, Simonescu M, Kaul P, Hendricks K, Faraone SV (2011) Advances in understanding and treating ADHD. *BMC Med* 9:72.
- Applegate B, Lahey BB, Hart EL, Biederman J, Hynd GW, Barkley RA, Ollendick T, Frick PJ, Greenhill L, McBurnett K, Newcorn JH, Kerdyk L, Garfinkel B, Waldman I, Shaffer D (1997) Validity of the age-of-onset criterion for ADHD: a report from the DSM-IV field trials. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 36:1211-1221.
- Ardayfio PA, Leung A, Park J, Hwang DY, Moran-Gates T, Choi YK, Carlezon WA, Jr., Tarazi FI, Kim KS (2010) Pitx3-deficient aphakia mice display unique behavioral responses to psychostimulant and antipsychotic drugs. *Neuroscience* 166:391-396.
- Arnsten AF (2006) Stimulants: Therapeutic actions in ADHD. *Neuropsychopharmacology* 31:2376-2383.
- Arnt J, Bogeso KP, Hyttel J, Meier E (1988) Relative dopamine D1 and D2 receptor affinity and efficacy determine whether dopamine agonists induce hyperactivity or oral stereotypy in rats. *Pharmacol Toxicol* 62:121-130.
- Autti-Ramo I (2000) Twelve-year follow-up of children exposed to alcohol in utero. *Dev Med Child Neurol* 42:406-411.
- Avale ME, Nemirovsky SI, Raisman-Vozari R, Rubinstein M (2004a) Elevated serotonin is involved in hyperactivity but not in the paradoxical effect of amphetamine in mice neonatally lesioned with 6-hydroxydopamine. *J Neurosci Res* 78:289-296.
- Avale ME, Falzone TL, Gelman DM, Low MJ, Grandy DK, Rubinstein M (2004b) The dopamine D4 receptor is essential for hyperactivity and impaired behavioral inhibition in a mouse model of attention deficit/hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 9:718-726.
- Beaulieu JM, Gainetdinov RR (2011) The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev* 63:182-217.

- 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.
- Benavides DR, Bibb JA (2004) Role of Cdk5 in drug abuse and plasticity. *Ann N Y Acad Sci* 1025:335-344.
- 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.
- Berridge CW, Devilbiss DM, Andrzejewski ME, Arnsten AF, Kelley AE, Schmeichel B, Hamilton C, Spencer RC (2006) Methylphenidate preferentially increases catecholamine neurotransmission within the prefrontal cortex at low doses that enhance cognitive function. *Biol Psychiatry* 60:1111-1120.
- Berridge KC, Aldridge JW, Houchard KR, Zhuang X (2005) Sequential super-stereotypy of an instinctive fixed action pattern in hyper-dopaminergic mutant mice: a model of obsessive compulsive disorder and Tourette's. *BMC Biol* 3:4.
- Best JA, Nijhout HF, Reed MC (2009) Homeostatic mechanisms in dopamine synthesis and release: a mathematical model. *Theor Biol Med Model* 6:21.
- Bhutta AT, Cleves MA, Casey PH, Cradock MM, Anand KJ (2002) Cognitive and behavioral outcomes of school-aged children who were born preterm: a meta-analysis. *JAMA* 288:728-737.
- Bibb JA, Chen J, Taylor JR, Svenningsson P, Nishi A, Snyder GL, Yan Z, Sagawa ZK, Ouimet CC, Nairn AC, Nestler EJ, Greengard P (2001) Effects of chronic exposure to cocaine are regulated by the neuronal protein Cdk5. *Nature* 410:376-380.
- Bibb JA, Snyder GL, Nishi A, Yan Z, Meijer L, Fienberg AA, Tsai LH, Kwon YT, Girault JA, Czernik AJ, Haganir RL, Hemmings HC, Jr., Nairn AC, Greengard P (1999) Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 modulates dopamine signalling in neurons. *Nature* 402:669-671.
- Biederman J (2005) Attention-deficit/hyperactivity disorder: a selective overview. *Biol Psychiatry* 57:1215-1220.
- Biederman J, Faraone SV (2005) Attention-deficit hyperactivity disorder. *Lancet* 366:237-248.
- Biederman J, Milberger S, Faraone SV, Kiely K, Guite J, Mick E, Ablon S, Warburton R, Reed E (1995) Family-environment risk factors for attention-deficit hyperactivity disorder. A test of Rutter's indicators of adversity. *Arch Gen Psychiatry* 52:464-470.
- Bignante EA, Paglini G, Molina VA (2010) Previous stress exposure enhances both anxiety-like behaviour and p35 levels in the basolateral amygdala complex: modulation by midazolam. *Eur Neuropsychopharmacol* 20:388-397.
- Bignante EA, Rodriguez Manzanares PA, Mlewski EC, Bertotto ME, Bussolino DF, Paglini G, Molina VA (2008) Involvement of septal Cdk5 in the emergence of excessive anxiety induced by stress. *Eur Neuropsychopharmacol* 18:578-588.
- Bjorklund A, Dunnett SB (2007a) Fifty years of dopamine research. *Trends Neurosci* 30:185-187.

- Bjorklund A, Dunnett SB (2007b) Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci* 30:194-202.
- Bloch MH, Panza KE, Landeros-Weisenberger A, Leckman JF (2009) Meta-analysis: treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder in children with comorbid tic disorders. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 48:884-893.
- Blum K, Chen AL, Braverman ER, Comings DE, Chen TJ, Arcuri V, Blum SH, Downs BW, Waite RL, Notaro A, Lubar J, Williams L, Prihoda TJ, Palomo T, Oscar-Berman M (2008) Attention-deficit-hyperactivity disorder and reward deficiency syndrome. *Neuropsychiatr Dis Treat* 4:893-918.
- Boksa P, El-Khodori BF (2003) Birth insult interacts with stress at adulthood to alter dopaminergic function in animal models: possible implications for schizophrenia and other disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 27:91-101.
- Bolam JP, Hanley JJ, Booth PA, Bevan MD (2000) Synaptic organisation of the basal ganglia. *J Anat* 196 (Pt 4):527-542.
- Bonci A, Hopf FW (2005) The dopamine D2 receptor: new surprises from an old friend. *Neuron* 47:335-338.
- Boomsma DI, Saviouk V, Hottenga JJ, Distel MA, de Moor MH, Vink JM, Geels LM, van Beek JH, Bartels M, de Geus EJ, Willemsen G (2010) Genetic epidemiology of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD index) in adults. *PLoS One* 5:e10621.
- Bordi F, Meller E (1989) Enhanced behavioral stereotypies elicited by intrastriatal injection D1 and D2 dopamine agonists in intact rats. *Brain Res* 504:276-283.
- Brookes K et al. (2006) The analysis of 51 genes in DSM-IV combined type attention deficit hyperactivity disorder: association signals in DRD4, DAT1 and 16 other genes. *Mol Psychiatry* 11:934-953.
- Brown RT, Amler RW, Freeman WS, Perrin JM, Stein MT, Feldman HM, Pierce K, Wolraich ML (2005) Treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder: overview of the evidence. *Pediatrics* 115:e749-757.
- Calzavara MB, Lopez GB, Abilio VC, Silva RH, Frussa-Filho R (2004) Role of anxiety levels in memory performance of spontaneously hypertensive rats. *Behav Pharmacol* 15:545-553.
- Carey RJ, Huston JP, Muller CP (2008) Pharmacological inhibition of dopamine and serotonin activity blocks spontaneous and cocaine-activated behaviour. *Prog Brain Res* 172:347-360.
- Carlsson A (2001) A paradigm shift in brain research. *Science* 294:1021-1024.
- Carlsson A (2002) Treatment of Parkinson's with L-DOPA. The early discovery phase, and a comment on current problems. *J Neural Transm* 109:777-787.
- Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T (1957) 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature* 180:1200.

- Carlsson A, Kehr W, Lindqvist M (1977) Agonist--antagonist interaction on dopamine receptors in brain, as reflected in the rates of tyrosine and tryptophan hydroxylation. *J Neural Transm* 40:99-113.
- Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T, Waldeck B (1958) On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. *Science* 127:471.
- Carpenter AC, Saborido TP, Stanwood GD (2012) Development of hyperactivity and anxiety responses in dopamine transporter-deficient mice. *Dev Neurosci* 34:250-257.
- Castellanos FX, Tannock R (2002) Neuroscience of attention-deficit/hyperactivity disorder: the search for endophenotypes. *Nat Rev Neurosci* 3:617-628.
- Castellanos FX, Lee PP, Sharp W, Jeffries NO, Greenstein DK, Clasen LS, Blumenthal JD, James RS, Ebens CL, Walter JM, Zijdenbos A, Evans AC, Giedd JN, Rapoport JL (2002) Developmental trajectories of brain volume abnormalities in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. *JAMA* 288:1740-1748.
- Cave JW, Baker H (2009) Dopamine systems in the forebrain. *Adv Exp Med Biol* 651:15-35.
- Centonze D, Grande C, Saulle E, Martin AB, Gubellini P, Pavon N, Pisani A, Bernardi G, Moratalla R, Calabresi P (2003) Distinct roles of D1 and D5 dopamine receptors in motor activity and striatal synaptic plasticity. *J Neurosci* 23:8506-8512.
- Corbit LH, Muir JL, Balleine BW (2001) The role of the nucleus accumbens in instrumental conditioning: Evidence of a functional dissociation between accumbens core and shell. *J Neurosci* 21:3251-3260.
- Cotzias GC, Van Woert MH, Schiffer LM (1967) Aromatic amino acids and modification of parkinsonism. *N Engl J Med* 276:374-379.
- Cruz JC, Tseng HC, Goldman JA, Shih H, Tsai LH (2003) Aberrant Cdk5 activation by p25 triggers pathological events leading to neurodegeneration and neurofibrillary tangles. *Neuron* 40:471-483.
- Cussac D, Newman-Tancredi A, Pasteau V, Millan MJ (1999) Human dopamine D(3) receptors mediate mitogen-activated protein kinase activation via a phosphatidylinositol 3-kinase and an atypical protein kinase C-dependent mechanism. *Mol Pharmacol* 56:1025-1030.
- Chae T, Kwon YT, Bronson R, Dikkes P, Li E, Tsai LH (1997) Mice lacking p35, a neuronal specific activator of Cdk5, display cortical lamination defects, seizures, and adult lethality. *Neuron* 18:29-42.
- Chang MY, Lee SH, Kim JH, Lee KH, Kim YS, Son H, Lee YS (2001) Protein kinase C-mediated functional regulation of dopamine transporter is not achieved by direct phosphorylation of the dopamine transporter protein. *J Neurochem* 77:754-761.
- Chen R, Han DD, Gu HH (2005) A triple mutation in the second transmembrane domain of mouse dopamine transporter markedly decreases sensitivity to cocaine and methylphenidate. *J Neurochem* 94:352-359.

- Chen R, Tilley MR, Wei H, Zhou F, Zhou FM, Ching S, Quan N, Stephens RL, Hill ER, Nottoli T, Han DD, Gu HH (2006) Abolished cocaine reward in mice with a cocaine-insensitive dopamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:9333-9338.
- Cheng K, Ip NY (2003) Cdk5: a new player at synapses. *Neurosignals* 12:180-190.
- Chergui K, Svenningsson P, Greengard P (2004) Cyclin-dependent kinase 5 regulates dopaminergic and glutamatergic transmission in the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2191-2196.
- Cheung ZH, Ip NY (2012) Cdk5: a multifaceted kinase in neurodegenerative diseases. *Trends Cell Biol* 22:169-175.
- Cheung ZH, Fu AK, Ip NY (2006) Synaptic roles of Cdk5: implications in higher cognitive functions and neurodegenerative diseases. *Neuron* 50:13-18.
- Chi L, Reith ME (2003) Substrate-induced trafficking of the dopamine transporter in heterologously expressing cells and in rat striatal synaptosomal preparations. *J Pharmacol Exp Ther* 307:729-736.
- Daubner SC, Le T, Wang S (2011) Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch Biochem Biophys* 508:1-12.
- De Mei C, Ramos M, Iitaka C, Borrelli E (2009) Getting specialized: presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors. *Curr Opin Pharmacol* 9:53-58.
- Del Campo N, Chamberlain SR, Sahakian BJ, Robbins TW (2011) The roles of dopamine and noradrenaline in the pathophysiology and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 69:e145-157.
- Delalle I, Bhide PG, Caviness VS, Jr., Tsai LH (1997) Temporal and spatial patterns of expression of p35, a regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5, in the nervous system of the mouse. *J Neurocytol* 26:283-296.
- Devan BD, White NM (1999) Parallel information processing in the dorsal striatum: relation to hippocampal function. *J Neurosci* 19:2789-2798.
- Dhavan R, Tsai LH (2001) A decade of CDK5. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:749-759.
- Di Chiara G, Porceddu ML, Fratta W, Gessa GL (1977) Postsynaptic receptors are not essential for dopaminergic feedback regulation. *Nature* 267:270-272.
- Dias FR, de Matos LW, Sampaio Mde F, Carey RJ, Carrera MP (2012) Opposite effects of low versus high dose haloperidol treatments on spontaneous and apomorphine induced motor behavior: evidence that at a very low dose haloperidol acts as an indirect dopamine agonist. *Behav Brain Res* 229:153-159.
- Diaz Heijtz R, Castellanos FX (2006) Differential effects of a selective dopamine D1-like receptor agonist on motor activity and c-fos expression in the frontal-striatal circuitry of SHR and Wistar-Kyoto rats. *Behav Brain Funct* 2:18.

- Diaz Heijtz R, Scott L, Forssberg H (2004) Alteration of dopamine D1 receptor-mediated motor inhibition and stimulation during development in rats is associated with distinct patterns of c-fos mRNA expression in the frontal-striatal circuitry. *Eur J Neurosci* 19:945-956.
- Dracheva S, Haroutunian V (2001) Locomotor behavior of dopamine D1 receptor transgenic/D2 receptor deficient hybrid mice. *Brain Res* 905:142-151.
- Dracheva S, Xu M, Kelley KA, Haroutunian V, Holstein GR, Haun S, Silverstein JH, Sealfon SC (1999) Paradoxical locomotor behavior of dopamine D1 receptor transgenic mice. *Exp Neurol* 157:169-179.
- Drago J, Gerfen CR, Westphal H, Steiner H (1996) D1 dopamine receptor-deficient mouse: cocaine-induced regulation of immediate-early gene and substance P expression in the striatum. *Neuroscience* 74:813-823.
- Drago J, Gerfen CR, Lachowicz JE, Steiner H, Hollon TR, Love PE, Ooi GT, Grinberg A, Lee EJ, Huang SP, et al. (1994) Altered striatal function in a mutant mouse lacking D1A dopamine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12564-12568.
- Drerup JM, Hayashi K, Cui H, Mettlach GL, Long MA, Marvin M, Sun X, Goldberg MS, Lutter M, Bibb JA (2010) Attention-deficit/hyperactivity phenotype in mice lacking the cyclin-dependent kinase 5 cofactor p35. *Biol Psychiatry* 68:1163-1171.
- Dunkley PR, Bobrovskaya L, Graham ME, von Nagy-Felsobuki EI, Dickson PW (2004) Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences. *J Neurochem* 91:1025-1043.
- Elsworth JD, Roth RH (1997) Dopamine synthesis, uptake, metabolism, and receptors: relevance to gene therapy of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 144:4-9.
- Elliott R (2003) Executive functions and their disorders. *Br Med Bull* 65:49-59.
- Ellis B, Nigg J (2009) Parenting practices and attention-deficit/hyperactivity disorder: new findings suggest partial specificity of effects. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 48:146-154.
- Ernst M, Zametkin AJ, Phillips RL, Cohen RM (1998) Age-related changes in brain glucose metabolism in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder and control subjects. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 10:168-177.
- Ernst M, Zametkin AJ, Matochik JA, Pascualvaca D, Jons PH, Cohen RM (1999) High midbrain [18F]DOPA accumulation in children with attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry* 156:1209-1215.
- Evenden JL (1999) Varieties of impulsivity. *Psychopharmacology (Berl)* 146:348-361.
- Everitt BJ, Robbins TW (2005) Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci* 8:1481-1489.
- Fan X, Hess EJ (2007) D2-like dopamine receptors mediate the response to amphetamine in a mouse model of ADHD. *Neurobiol Dis* 26:201-211.

- Fan X, Xu M, Hess EJ (2010) D2 dopamine receptor subtype-mediated hyperactivity and amphetamine responses in a model of ADHD. *Neurobiol Dis* 37:228-236.
- Faraone SV, Wilens TE (2007) Effect of stimulant medications for attention-deficit/hyperactivity disorder on later substance use and the potential for stimulant misuse, abuse, and diversion. *J Clin Psychiatry* 68 Suppl 11:15-22.
- Faraone SV, Mick E (2010) Molecular genetics of attention deficit hyperactivity disorder. *Psychiatr Clin North Am* 33:159-180.
- Faraone SV, Sergeant J, Gillberg C, Biederman J (2003) The worldwide prevalence of ADHD: is it an American condition? *World Psychiatry* 2:104-113.
- Faraone SV, Biederman J, Morley CP, Spencer TJ (2008) Effect of stimulants on height and weight: a review of the literature. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 47:994-1009.
- Faraone SV, Perlis RH, Doyle AE, Smoller JW, Goralnick JJ, Holmgren MA, Sklar P (2005) Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 57:1313-1323.
- Fischer A, Sananbenesi F, Schrick C, Spiess J, Radulovic J (2002) Cyclin-dependent kinase 5 is required for associative learning. *J Neurosci* 22:3700-3707.
- Fischer A, Sananbenesi F, Pang PT, Lu B, Tsai LH (2005) Opposing roles of transient and prolonged expression of p25 in synaptic plasticity and hippocampus-dependent memory. *Neuron* 48:825-838.
- Floresco SB (2007) Dopaminergic regulation of limbic-striatal interplay. *J Psychiatry Neurosci* 32:400-411.
- Floresco SB, Todd CL, Grace AA (2001) Glutamatergic afferents from the hippocampus to the nucleus accumbens regulate activity of ventral tegmental area dopamine neurons. *J Neurosci* 21:4915-4922.
- Floresco SB, McLaughlin RJ, Haluk DM (2008) Opposing roles for the nucleus accumbens core and shell in cue-induced reinstatement of food-seeking behavior. *Neuroscience* 154:877-884.
- Floresco SB, Ghods-Sharifi S, Vexelman C, Magyar O (2006) Dissociable roles for the nucleus accumbens core and shell in regulating set shifting. *J Neurosci* 26:2449-2457.
- Floresco SB, West AR, Ash B, Moore H, Grace AA (2003) Afferent modulation of dopamine neuron firing differentially regulates tonic and phasic dopamine transmission. *Nat Neurosci* 6:968-973.
- Forssberg H, Fernell E, Waters S, Waters N, Tedroff J (2006) Altered pattern of brain dopamine synthesis in male adolescents with attention deficit hyperactivity disorder. *Behav Brain Funct* 2:40.
- Fujisawa H, Okuno S (2005) Regulatory mechanism of tyrosine hydroxylase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 338:271-276.
- Fung YK, Uretsky NJ (1982) The importance of calcium in the amphetamine-induced stimulation of dopamine synthesis in mouse striata in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 223:477-482.

- Furman CA, Chen R, Guptaroy B, Zhang M, Holz RW, Gnegy M (2009) Dopamine and amphetamine rapidly increase dopamine transporter trafficking to the surface: live-cell imaging using total internal reflection fluorescence microscopy. *J Neurosci* 29:3328-3336.
- Gainetdinov RR, Caron MG (2001) Genetics of childhood disorders: XXIV. ADHD, part 8: hyperdopaminergic mice as an animal model of ADHD. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 40:380-382.
- Gainetdinov RR, Premont RT, Bohn LM, Lefkowitz RJ, Caron MG (2004) Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annu Rev Neurosci* 27:107-144.
- Gainetdinov RR, Wetsel WC, Jones SR, Levin ED, Jaber M, Caron MG (1999) Role of serotonin in the paradoxical calming effect of psychostimulants on hyperactivity. *Science* 283:397-401.
- Garris PA, Budygin EA, Phillips PE, Venton BJ, Robinson DL, Bergstrom BP, Rebec GV, Wightman RM (2003) A role for presynaptic mechanisms in the actions of nomifensine and haloperidol. *Neuroscience* 118:819-829.
- Gauthier J, Parent M, Levesque M, Parent A (1999) The axonal arborization of single nigrostriatal neurons in rats. *Brain Res* 834:228-232.
- German DC, Manaye KF (1993) Midbrain dopaminergic neurons (nuclei A8, A9, and A10): three-dimensional reconstruction in the rat. *J Comp Neurol* 331:297-309.
- Gesi M, Santinami A, Ruffoli R, Conti G, Fornai F (2001) Novel aspects of dopamine oxidative metabolism (confounding outcomes take place of certainties). *Pharmacol Toxicol* 89:217-224.
- Goodwin JS, Larson GA, Swant J, Sen N, Javitch JA, Zahniser NR, De Felice LJ, Khoshbouei H (2009) Amphetamine and methamphetamine differentially affect dopamine transporters in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 284:2978-2989.
- Gordon SL, Quinsey NS, Dunkley PR, Dickson PW (2008) Tyrosine hydroxylase activity is regulated by two distinct dopamine-binding sites. *J Neurochem* 106:1614-1623.
- Goto Y, Otani S, Grace AA (2007) The Yin and Yang of dopamine release: a new perspective. *Neuropharmacology* 53:583-587.
- Grace AA (2000) The tonic/phasic model of dopamine system regulation and its implications for understanding alcohol and psychostimulant craving. *Addiction* 95 Suppl 2:S119-128.
- Grace AA, Bunney BS (1984a) The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing. *J Neurosci* 4:2877-2890.
- Grace AA, Bunney BS (1984b) The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing. *J Neurosci* 4:2866-2876.
- Gramatte T, Schmidt J (1986) The effect of early postnatal hypoxia on the development of locomotor activity in rats. *Biomed Biochim Acta* 45:523-529.
- Gray JD, Punsoni M, Tabori NE, Melton JT, Fanslow V, Ward MJ, Zupan B, Menzer D, Rice J, Drake CT, Romeo RD, Brake WG, Torres-Reveron A, Milner TA (2007) Methylphenidate administration to

- juvenile rats alters brain areas involved in cognition, motivated behaviors, appetite, and stress. *J Neurosci* 27:7196-7207.
- Greengard P (2001a) The neurobiology of slow synaptic transmission. *Science* 294:1024-1030.
- Greengard P (2001b) The neurobiology of dopamine signaling. *Biosci Rep* 21:247-269.
- Groenewegen HJ, Trimble M (2007) The ventral striatum as an interface between the limbic and motor systems. *CNS Spectr* 12:887-892.
- Haber H, Dumaul N, Bare DJ, Melzig MF, McBride WF, Lumeng L, Li TK (1999) The quantitative determination of R- and S-salsolinol in the striatum and adrenal gland of rats selectively bred for disparate alcohol drinking. *Addict Biol* 4:181-189.
- Halbleib JM, Nelson WJ (2006) Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes Dev* 20:3199-3214.
- Halpain S, Girault JA, Greengard P (1990) Activation of NMDA receptors induces dephosphorylation of DARPP-32 in rat striatal slices. *Nature* 343:369-372.
- He L, Hou Z, Qi RZ (2008) Calmodulin binding and Cdk5 phosphorylation of p35 regulate its effect on microtubules. *J Biol Chem* 283:13252-13260.
- Hellmich MR, Pant HC, Wada E, Battey JF (1992) Neuronal cdc2-like kinase: a cdc2-related protein kinase with predominantly neuronal expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10867-10871.
- Hemmings HC, Jr., Greengard P, Tung HY, Cohen P (1984) DARPP-32, a dopamine-regulated neuronal phosphoprotein, is a potent inhibitor of protein phosphatase-1. *Nature* 310:503-505.
- Hisanaga S, Saito T (2003) The regulation of cyclin-dependent kinase 5 activity through the metabolism of p35 or p39 Cdk5 activator. *Neurosignals* 12:221-229.
- Holmes A, Hollon TR, Gleason TC, Liu Z, Dreiling J, Sibley DR, Crawley JN (2001) Behavioral characterization of dopamine D5 receptor null mutant mice. *Behav Neurosci* 115:1129-1144.
- Hoover BR, Everett CV, Sorkin A, Zahniser NR (2007) Rapid regulation of dopamine transporters by tyrosine kinases in rat neuronal preparations. *J Neurochem* 101:1258-1271.
- Iversen SD, Iversen LL (2007) Dopamine: 50 years in perspective. *Trends Neurosci* 30:188-193.
- Jakel RJ, Maragos WF (2000) Neuronal cell death in Huntington's disease: a potential role for dopamine. *Trends Neurosci* 23:239-245.
- Jedynak JP, Ali SF, Haycock JW, Hope BT (2002) Acute administration of cocaine regulates the phosphorylation of serine-19, -31 and -40 in tyrosine hydroxylase. *J Neurochem* 82:382-388.
- Johansen EB, Aase H, Meyer A, Sagvolden T (2002) Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) behaviour explained by dysfunctioning reinforcement and extinction processes. *Behav Brain Res* 130:37-45.
- Jones SR, Gainetdinov RR, Hu XT, Cooper DC, Wightman RM, White FJ, Caron MG (1999) Loss of autoreceptor functions in mice lacking the dopamine transporter. *Nat Neurosci* 2:649-655.

- Joyce JN, Gurevich EV (1999) D3 receptors and the actions of neuroleptics in the ventral striatopallidal system of schizophrenics. *Ann N Y Acad Sci* 877:595-613.
- Kahlig KM, Galli A (2003) Regulation of dopamine transporter function and plasma membrane expression by dopamine, amphetamine, and cocaine. *Eur J Pharmacol* 479:153-158.
- Kansy JW, Daubner SC, Nishi A, Sotogaku N, Lloyd MD, Nguyen C, Lu L, Haycock JW, Hope BT, Fitzpatrick PF, Bibb JA (2004) Identification of tyrosine hydroxylase as a physiological substrate for Cdk5. *J Neurochem* 91:374-384.
- Kerokoski P, Suuronen T, Salminen A, Soininen H, Pirttila T (2002) Influence of phosphorylation of p35, an activator of cyclin-dependent kinase 5 (cdk5), on the proteolysis of p35. *Brain Res Mol Brain Res* 106:50-56.
- Kessler RC, Adler L, Barkley R, Biederman J, Conners CK, Demler O, Faraone SV, Greenhill LL, Howes MJ, Secnik K, Spencer T, Ustun TB, Walters EE, Zaslavsky AM (2006) The prevalence and correlates of adult ADHD in the United States: results from the National Comorbidity Survey Replication. *Am J Psychiatry* 163:716-723.
- Kim DS, Szczypka MS, Palmiter RD (2000) Dopamine-deficient mice are hypersensitive to dopamine receptor agonists. *J Neurosci* 20:4405-4413.
- Kim Y, Sung JY, Ceglia I, Lee KW, Ahn JH, Halford JM, Kim AM, Kwak SP, Park JB, Ho Ryu S, Schenck A, Bardoni B, Scott JD, Nairn AC, Greengard P (2006) Phosphorylation of WAVE1 regulates actin polymerization and dendritic spine morphology. *Nature* 442:814-817.
- Ko J, Humbert S, Bronson RT, Takahashi S, Kulkarni AB, Li E, Tsai LH (2001) p35 and p39 are essential for cyclin-dependent kinase 5 function during neurodevelopment. *J Neurosci* 21:6758-6771.
- Kollins SH (2008) ADHD, substance use disorders, and psychostimulant treatment: current literature and treatment guidelines. *J Atten Disord* 12:115-125.
- Konrad A, Dielentheis TF, El Masri D, Dellani PR, Stoeter P, Vucurevic G, Winterer G (2012) White matter abnormalities and their impact on attentional performance in adult attention-deficit/hyperactivity disorder. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 262:351-360.
- Konrad A, Dielentheis TF, El Masri D, Bayerl M, Fehr C, Gesierich T, Vucurevic G, Stoeter P, Winterer G (2010) Disturbed structural connectivity is related to inattention and impulsivity in adult attention deficit hyperactivity disorder. *Eur J Neurosci* 31:912-919.
- Krapacher FA, Mlewski EC, Ferreras S, Pisano V, Paolorossi M, Hansen C, Paglini G (2010) Mice lacking p35 display hyperactivity and paradoxical response to psychostimulants. *J Neurochem* 114:203-214.
- Kreppner JM, O'Connor TG, Rutter M (2001) Can inattention/overactivity be an institutional deprivation syndrome? *J Abnorm Child Psychol* 29:513-528.
- Kumer SC, Vrana KE (1996) Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J Neurochem* 67:443-462.

- Kuwagata M, Muneoka KT, Ogawa T, Takigawa M, Nagao T (2004) Locomotor hyperactivity following prenatal exposure to 5-bromo-2'-deoxyuridine: neurochemical and behavioral evidence of dopaminergic and serotonergic alterations. *Toxicol Lett* 152:63-71.
- Kuzhikandathil EV, Oxford GS (1999) Activation of human D3 dopamine receptor inhibits P/Q-type calcium channels and secretory activity in AtT-20 cells. *J Neurosci* 19:1698-1707.
- Kuznetsova AY, Deth RC (2008) A model for modulation of neuronal synchronization by D4 dopamine receptor-mediated phospholipid methylation. *J Comput Neurosci* 24:314-329.
- Kwon YT, Tsai LH (1998) A novel disruption of cortical development in p35(-/-) mice distinct from reeler. *J Comp Neurol* 395:510-522.
- Kwon YT, Gupta A, Zhou Y, Nikolic M, Tsai LH (2000) Regulation of N-cadherin-mediated adhesion by the p35-Cdk5 kinase. *Curr Biol* 10:363-372.
- Laatikainen LM, Sharp T, Harrison PJ, Tunbridge EM (2013) Sexually dimorphic effects of catechol-O-methyltransferase (COMT) inhibition on dopamine metabolism in multiple brain regions. *PLoS One* 8:e61839.
- Lalioti V, Pulido D, Sandoval IV (2010) Cdk5, the multifunctional surveyor. *Cell Cycle* 9:284-311.
- Lammel S, Hetzel A, Hackel O, Jones I, Liss B, Roeper J (2008) Unique properties of mesoprefrontal neurons within a dual mesocorticolimbic dopamine system. *Neuron* 57:760-773.
- Lange KW, Reichl S, Lange KM, Tucha L, Tucha O (2010) The history of attention deficit hyperactivity disorder. *Atten Defic Hyperact Disord* 2:241-255.
- Langen B, Dost R (2011) Comparison of SHR, WKY and Wistar rats in different behavioural animal models: effect of dopamine D1 and alpha2 agonists. *Atten Defic Hyperact Disord* 3:1-12.
- Larsen KE, Fon EA, Hastings TG, Edwards RH, Sulzer D (2002) Methamphetamine-induced degeneration of dopaminergic neurons involves autophagy and upregulation of dopamine synthesis. *J Neurosci* 22:8951-8960.
- Laruelle M, Abi-Dargham A, Gil R, Kegeles L, Innis R (1999) Increased dopamine transmission in schizophrenia: relationship to illness phases. *Biol Psychiatry* 46:56-72.
- Lee KW, Hong JH, Choi IY, Che Y, Lee JK, Yang SD, Song CW, Kang HS, Lee JH, Noh JS, Shin HS, Han PL (2002) Impaired D2 dopamine receptor function in mice lacking type 5 adenylyl cyclase. *J Neurosci* 22:7931-7940.
- Lee MS, Kwon YT, Li M, Peng J, Friedlander RM, Tsai LH (2000) Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature* 405:360-364.
- Lee SI, Schachar RJ, Chen SX, Ornstein TJ, Charach A, Barr C, Ickowicz A (2008) Predictive validity of DSM-IV and ICD-10 criteria for ADHD and hyperkinetic disorder. *J Child Psychol Psychiatry* 49:70-78.
- Lee SY, Voronov S, Letinic K, Nairn AC, Di Paolo G, De Camilli P (2005) Regulation of the interaction between PIPKI gamma and talin by proline-directed protein kinases. *J Cell Biol* 168:789-799.

- Leviel V (2011) Dopamine release mediated by the dopamine transporter, facts and consequences. *J Neurochem* 118:475-489.
- Levy F, Hay DA, McStephen M, Wood C, Waldman I (1997) Attention-deficit hyperactivity disorder: a category or a continuum? Genetic analysis of a large-scale twin study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 36:737-744.
- Li BS, Sun MK, Zhang L, Takahashi S, Ma W, Vinade L, Kulkarni AB, Brady RO, Pant HC (2001) Regulation of NMDA receptors by cyclin-dependent kinase-5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12742-12747.
- Li D, Sham PC, Owen MJ, He L (2006) Meta-analysis shows significant association between dopamine system genes and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Hum Mol Genet* 15:2276-2284.
- Li M, Fleming AS (2003) The nucleus accumbens shell is critical for normal expression of pup-retrieval in postpartum female rats. *Behav Brain Res* 145:99-111.
- Lidsky TI, Banerjee SP (1993) Acute administration of haloperidol enhances dopaminergic transmission. *J Pharmacol Exp Ther* 265:1193-1198.
- Ligon LA, Karki S, Tokito M, Holzbaur EL (2001) Dynein binds to beta-catenin and may tether microtubules at adherens junctions. *Nat Cell Biol* 3:913-917.
- Lindskog M, Svenningsson P, Fredholm BB, Greengard P, Fisone G (1999) Activation of dopamine D2 receptors decreases DARPP-32 phosphorylation in striatonigral and striatopallidal projection neurons via different mechanisms. *Neuroscience* 88:1005-1008.
- Little KY, Elmer LW, Zhong H, Scheys JO, Zhang L (2002) Cocaine induction of dopamine transporter trafficking to the plasma membrane. *Mol Pharmacol* 61:436-445.
- Liu F, Wan Q, Pristupa ZB, Yu XM, Wang YT, Niznik HB (2000) Direct protein-protein coupling enables cross-talk between dopamine D5 and gamma-aminobutyric acid A receptors. *Nature* 403:274-280.
- Liu Y, Cheng K, Gong K, Fu AK, Ip NY (2006) Pctaire1 phosphorylates N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein: implications in the regulation of its hexamerization and exocytosis. *J Biol Chem* 281:9852-9858.
- Loder MK, Melikian HE (2003) The dopamine transporter constitutively internalizes and recycles in a protein kinase C-regulated manner in stably transfected PC12 cell lines. *J Biol Chem* 278:22168-22174.
- Lopez-Munoz F, Alamo C, Quintero-Gutierrez FJ, Garcia-Garcia P (2008) A bibliometric study of international scientific productivity in attention-deficit hyperactivity disorder covering the period 1980-2005. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 17:381-391.
- Loughlin SE, Fallon JH (1984) Substantia nigra and ventral tegmental area projections to cortex: topography and collateralization. *Neuroscience* 11:425-435.
- Ludolph AG, Kassubek J, Schmeck K, Glaser C, Wunderlich A, Buck AK, Reske SN, Fegert JM, Mottaghy FM (2008) Dopaminergic dysfunction in attention deficit hyperactivity disorder (ADHD), differences

- between pharmacologically treated and never treated young adults: a 3,4-dihydroxy-6-[18F]fluorophenyl-L-alanine PET study. *Neuroimage* 41:718-727.
- Luman M, Oosterlaan J, Sergeant JA (2005) The impact of reinforcement contingencies on AD/HD: a review and theoretical appraisal. *Clin Psychol Rev* 25:183-213.
- Luquin-Piudo MR, Sanz P (2011) Dopamine receptors, motor responses, and dopaminergic agonists. *Neurologist* 17:S2-8.
- Marsden CA (2006) Dopamine: the rewarding years. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1:S136-144.
- Melikian HE (2004) Neurotransmitter transporter trafficking: endocytosis, recycling, and regulation. *Pharmacol Ther* 104:17-27.
- Melikian HE, Buckley KM (1999) Membrane trafficking regulates the activity of the human dopamine transporter. *J Neurosci* 19:7699-7710.
- Mercuri NB, Saiardi A, Bonci A, Picetti R, Calabresi P, Bernardi G, Borrelli E (1997) Loss of autoreceptor function in dopaminergic neurons from dopamine D2 receptor deficient mice. *Neuroscience* 79:323-327.
- Meredith GE (1999) The synaptic framework for chemical signaling in nucleus accumbens. *Ann N Y Acad Sci* 877:140-156.
- Meredith GE, Pattiselanno A, Groenewegen HJ, Haber SN (1996) Shell and core in monkey and human nucleus accumbens identified with antibodies to calbindin-D28k. *J Comp Neurol* 365:628-639.
- Meyer ME, Cottrell GA, Van Hartesveldt C, Potter TJ (1993) Effects of dopamine D1 antagonists SCH23390 and SK&F83566 on locomotor activities in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 44:429-432.
- Mick E, Faraone SV (2008) Genetics of attention deficit hyperactivity disorder. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* 17:261-284, vii-viii.
- Mick E, Biederman J, Faraone SV, Sayer J, Kleinman S (2002) Case-control study of attention-deficit hyperactivity disorder and maternal smoking, alcohol use, and drug use during pregnancy. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 41:378-385.
- Mill J (2007) Rodent models: utility for candidate gene studies in human attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD). *J Neurosci Methods* 166:294-305.
- Mink JW (2006) Neurobiology of basal ganglia and Tourette syndrome: basal ganglia circuits and thalamocortical outputs. *Adv Neurol* 99:89-98.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78:189-225.
- Miyamoto Y, Yamauchi J, Chan JR, Okada A, Tomooka Y, Hisanaga S, Tanoue A (2007) Cdk5 regulates differentiation of oligodendrocyte precursor cells through the direct phosphorylation of paxillin. *J Cell Sci* 120:4355-4366.

- Mlewski EC, Krapacher FA, Ferreras S, Paglini G (2008) Transient enhanced expression of Cdk5 activator p25 after acute and chronic d-amphetamine administration. *Ann N Y Acad Sci* 1139:89-102.
- Mohn AR, Gainetdinov RR, Caron MG, Koller BH (1999) Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell* 98:427-436.
- Morabito MA, Sheng M, Tsai LH (2004) Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates the N-terminal domain of the postsynaptic density protein PSD-95 in neurons. *J Neurosci* 24:865-876.
- Morice E, Billard JM, Denis C, Mathieu F, Betancur C, Epelbaum J, Giros B, Nosten-Bertrand M (2007) Parallel loss of hippocampal LTD and cognitive flexibility in a genetic model of hyperdopaminergia. *Neuropsychopharmacology* 32:2108-2116.
- Mormede P, Moneva E, Bruneval C, Chaouloff F, Moisan MP (2002) Marker-assisted selection of a neuro-behavioural trait related to behavioural inhibition in the SHR strain, an animal model of ADHD. *Genes Brain Behav* 1:111-116.
- Moser M, Legate KR, Zent R, Fassler R (2009) The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science* 324:895-899.
- Moy LY, Tsai LH (2004) Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates serine 31 of tyrosine hydroxylase and regulates its stability. *J Biol Chem* 279:54487-54493.
- Napolitano F, Bonito-Oliva A, Federici M, Carta M, Errico F, Magara S, Martella G, Nistico R, Centonze D, Pisani A, Gu HH, Mercuri NB, Usiello A (2010) Role of aberrant striatal dopamine D1 receptor/cAMP/protein kinase A/DARPP32 signaling in the paradoxical calming effect of amphetamine. *J Neurosci* 30:11043-11056.
- Naughton BJ, Thirtamara-Rajamani K, Wang C, During MJ, Gu HH (2012) Specific knockdown of the D2 long dopamine receptor variant. *Neuroreport* 23:1-5.
- Nelson EL, Liang CL, Sinton CM, German DC (1996) Midbrain dopaminergic neurons in the mouse: computer-assisted mapping. *J Comp Neurol* 369:361-371.
- Nestler EJ (2001) Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci* 2:119-128.
- Nestler EJ (2005) Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat Neurosci* 8:1445-1449.
- Nestler EJ, Carlezon WA, Jr. (2006) The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol Psychiatry* 59:1151-1159.
- Nicola SM, Surmeier J, Malenka RC (2000) Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. *Annu Rev Neurosci* 23:185-215.
- Niculescu R, Petcu C, Cordeanu A, Fabritius K, Schlumpf M, Krebs R, Kramer U, Winneke G (2010) Environmental exposure to lead, but not other neurotoxic metals, relates to core elements of ADHD in Romanian children: performance and questionnaire data. *Environ Res* 110:476-483.
- Nieoullon A (2002) Dopamine and the regulation of cognition and attention. *Prog Neurobiol* 67:53-83.

- Nieoullon A, Coquerel A (2003) Dopamine: a key regulator to adapt action, emotion, motivation and cognition. *Curr Opin Neurol* 16 Suppl 2:S3-9.
- Nigg JT (2001) Is ADHD a disinhibitory disorder? *Psychol Bull* 127:571-598.
- Nigg JT (2005) Neuropsychologic theory and findings in attention-deficit/hyperactivity disorder: the state of the field and salient challenges for the coming decade. *Biol Psychiatry* 57:1424-1435.
- Nigg JT (2012) Future directions in ADHD etiology research. *J Clin Child Adolesc Psychol* 41:524-533.
- Nigg JT, Casey BJ (2005) An integrative theory of attention-deficit/ hyperactivity disorder based on the cognitive and affective neurosciences. *Dev Psychopathol* 17:785-806.
- Nigg JT, Swanson JM, Hinshaw SP (1997) Covert visual spatial attention in boys with attention deficit hyperactivity disorder: lateral effects, methylphenidate response and results for parents. *Neuropsychologia* 35:165-176.
- Nikolas MA, Burt SA (2010) Genetic and environmental influences on ADHD symptom dimensions of inattention and hyperactivity: a meta-analysis. *J Abnorm Psychol* 119:1-17.
- Nikolic M, Dudek H, Kwon YT, Ramos YF, Tsai LH (1996) The cdk5/p35 kinase is essential for neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Genes Dev* 10:816-825.
- Nirenberg MJ, Vaughan RA, Uhl GR, Kuhar MJ, Pickel VM (1996) The dopamine transporter is localized to dendritic and axonal plasma membranes of nigrostriatal dopaminergic neurons. *J Neurosci* 16:436-447.
- Nirenberg MJ, Chan J, Pohorille A, Vaughan RA, Uhl GR, Kuhar MJ, Pickel VM (1997) The dopamine transporter: comparative ultrastructure of dopaminergic axons in limbic and motor compartments of the nucleus accumbens. *J Neurosci* 17:6899-6907.
- Nishi A, Snyder GL, Greengard P (1997) Bidirectional regulation of DARPP-32 phosphorylation by dopamine. *J Neurosci* 17:8147-8155.
- Nishi A, Bibb JA, Snyder GL, Higashi H, Nairn AC, Greengard P (2000) Amplification of dopaminergic signaling by a positive feedback loop. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12840-12845.
- Ohno Y, Okano M, Masui A, Imaki J, Egawa M, Yoshihara C, Tatara A, Mizuguchi Y, Sasa M, Shimizu S (2012) Region-specific elevation of D(1) receptor-mediated neurotransmission in the nucleus accumbens of SHR, a rat model of attention deficit/hyperactivity disorder. *Neuropharmacology* 63:547-554.
- Ohshima T, Suzuki H, Morimura T, Ogawa M, Mikoshiba K (2007) Modulation of Reelin signaling by Cyclin-dependent kinase 5. *Brain Res* 1140:84-95.
- Okamoto K, Aoki K (1963) Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 27:282-293.
- Paglini G, Caceres A (2001) The role of the Cdk5--p35 kinase in neuronal development. *Eur J Biochem* 268:1528-1533.

- Paglini G, Peris L, Diez-Guerra J, Quiroga S, Caceres A (2001) The Cdk5-p35 kinase associates with the Golgi apparatus and regulates membrane traffic. *EMBO Rep* 2:1139-1144.
- Paglini G, Pigino G, Kunda P, Morfini G, Maccioni R, Quiroga S, Ferreira A, Caceres A (1998) Evidence for the participation of the neuron-specific CDK5 activator P35 during laminin-enhanced axonal growth. *J Neurosci* 18:9858-9869.
- Pan Y, Berman Y, Haberny S, Meller E, Carr KD (2006) Synthesis, protein levels, activity, and phosphorylation state of tyrosine hydroxylase in mesoaccumbens and nigrostriatal dopamine pathways of chronically food-restricted rats. *Brain Res* 1122:135-142.
- Pandithage R, Lilischkis R, Harting K, Wolf A, Jedamzik B, Luscher-Firzlaff J, Vervoorts J, Lasonder E, Kremmer E, Knoll B, Luscher B (2008) The regulation of SIRT2 function by cyclin-dependent kinases affects cell motility. *J Cell Biol* 180:915-929.
- Patrick GN, Zukerberg L, Nikolic M, de la Monte S, Dikkes P, Tsai LH (1999) Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* 402:615-622.
- Pecina S, Cagniard B, Berridge KC, Aldridge JW, Zhuang X (2003) Hyperdopaminergic mutant mice have higher "wanting" but not "liking" for sweet rewards. *J Neurosci* 23:9395-9402.
- Pierce K (2011) Treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Pediatr Ann* 40:556-562.
- Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:639-650.
- Pigino G, Paglini G, Ulloa L, Avila J, Caceres A (1997) Analysis of the expression, distribution and function of cyclin dependent kinase 5 (cdk5) in developing cerebellar macroneurons. *J Cell Sci* 110 (Pt 2):257-270.
- Pineda DA, Palacio LG, Puerta IC, Merchan V, Arango CP, Galvis AY, Gomez M, Aguirre DC, Lopera F, Arcos-Burgos M (2007) Environmental influences that affect attention deficit/hyperactivity disorder: study of a genetic isolate. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 16:337-346.
- Pivonello R, Ferone D, Lombardi G, Colao A, Lamberts SW, Hofland LJ (2007) Novel insights in dopamine receptor physiology. *Eur J Endocrinol* 156 Suppl 1:S13-21.
- Polanczyk G, de Lima MS, Horta BL, Biederman J, Rohde LA (2007) The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and meta-regression analysis. *Am J Psychiatry* 164:942-948.
- Posner MI, Petersen SE (1990) The attention system of the human brain. *Annu Rev Neurosci* 13:25-42.
- Qi Z, Miller GW, Voit EO (2008) Computational systems analysis of dopamine metabolism. *PLoS One* 3:e2444.
- Ralph RJ, Caine SB (2005) Dopamine D1 and D2 agonist effects on prepulse inhibition and locomotion: comparison of Sprague-Dawley rats to Swiss-Webster, 129X1/SvJ, C57BL/6J, and DBA/2J mice. *J Pharmacol Exp Ther* 312:733-741.

- Rashid T, Banerjee M, Nikolic M (2001) Phosphorylation of Pak1 by the p35/Cdk5 kinase affects neuronal morphology. *J Biol Chem* 276:49043-49052.
- Rebholz H, Zhou M, Nairn AC, Greengard P, Flajolet M (2013) Selective knockout of the casein kinase 2 in d1 medium spiny neurons controls dopaminergic function. *Biol Psychiatry* 74:113-121.
- Rebholz H, Nishi A, Liebscher S, Nairn AC, Flajolet M, Greengard P (2009) CK2 negatively regulates Galphas signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:14096-14101.
- Revol A, Comoy E, Forzy G, Garnier JP, Gerhardt MF, Hirth C, Jacob N, Mathieu P, Patricot MC, Peyrin L, et al. (1994) [Recommended methods for the determination of catecholamines and their metabolites in urine. Significance of results in the diagnosis and follow-up of pheochromocytoma and neuroblastoma]. *Ann Biol Clin (Paris)* 52:625-637.
- Reynolds SM, Berridge KC (2002) Positive and negative motivation in nucleus accumbens shell: bivalent rostrocaudal gradients for GABA-elicited eating, taste "liking"/"disliking" reactions, place preference/avoidance, and fear. *J Neurosci* 22:7308-7320.
- Rhodes JS, Garland T (2003) Differential sensitivity to acute administration of Ritalin, apomorphine, SCH 23390, but not raclopride in mice selectively bred for hyperactive wheel-running behavior. *Psychopharmacology (Berl)* 167:242-250.
- Rhodes JS, Hosack GR, Girard I, Kelley AE, Mitchell GS, Garland T, Jr. (2001) Differential sensitivity to acute administration of cocaine, GBR 12909, and fluoxetine in mice selectively bred for hyperactive wheel-running behavior. *Psychopharmacology (Berl)* 158:120-131.
- Rice F, Harold GT, Boivin J, van den Bree M, Hay DF, Thapar A (2010) The links between prenatal stress and offspring development and psychopathology: disentangling environmental and inherited influences. *Psychol Med* 40:335-345.
- Rice ME, Patel JC, Cragg SJ (2011) Dopamine release in the basal ganglia. *Neuroscience* 198:112-137.
- Richards TL, Zahniser NR (2009) Rapid substrate-induced down-regulation in function and surface localization of dopamine transporters: rat dorsal striatum versus nucleus accumbens. *J Neurochem* 108:1575-1584.
- Rivera A, Cuellar B, Giron FJ, Grandy DK, de la Calle A, Moratalla R (2002) Dopamine D4 receptors are heterogeneously distributed in the striosomes/matrix compartments of the striatum. *J Neurochem* 80:219-229.
- Robertson HR, Feng G (2011) Annual Research Review: Transgenic mouse models of childhood-onset psychiatric disorders. *J Child Psychol Psychiatry* 52:442-475.
- Robinson JB (1985) Stereoselectivity and isoenzyme selectivity of monoamine oxidase inhibitors. Enantiomers of amphetamine, N-methylamphetamine and deprenyl. *Biochem Pharmacol* 34:4105-4108.

- Robinson TE, Kolb B (1999) Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine. *Eur J Neurosci* 11:1598-1604.
- Robinson TE, Kolb B (2004) Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1:33-46.
- Rouge-Pont F, Usiello A, Benoit-Marand M, Gonon F, Piazza PV, Borrelli E (2002) Changes in extracellular dopamine induced by morphine and cocaine: crucial control by D2 receptors. *J Neurosci* 22:3293-3301.
- Russell V, de Villiers A, Sagvolden T, Lamm M, Taljaard J (1995) Altered dopaminergic function in the prefrontal cortex, nucleus accumbens and caudate-putamen of an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder--the spontaneously hypertensive rat. *Brain Res* 676:343-351.
- Russell VA (2011) Overview of animal models of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Curr Protoc Neurosci* Chapter 9:Unit9 35.
- Russell VA, Sagvolden T, Johansen EB (2005) Animal models of attention-deficit hyperactivity disorder. *Behav Brain Funct* 1:9.
- Sadile AG, Lamberti C, Siegfried B, Welzl H (1993) Circadian activity, nociceptive thresholds, nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic activity in the Naples High- and Low-Excitability rat lines. *Behav Brain Res* 55:17-27.
- Sagvolden T, Metzger MA, Sagvolden G (1993a) Frequent reward eliminates differences in activity between hyperkinetic rats and controls. *Behav Neural Biol* 59:225-229.
- Sagvolden T, Pettersen MB, Larsen MC (1993b) Spontaneously hypertensive rats (SHR) as a putative animal model of childhood hyperkinesis: SHR behavior compared to four other rat strains. *Physiol Behav* 54:1047-1055.
- Sagvolden T, Aase H, Zeiner P, Berger D (1998) Altered reinforcement mechanisms in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Behav Brain Res* 94:61-71.
- Sagvolden T, Johansen EB, Aase H, Russell VA (2005a) A dynamic developmental theory of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) predominantly hyperactive/impulsive and combined subtypes. *Behav Brain Sci* 28:397-419; discussion 419-368.
- Sagvolden T, Russell VA, Aase H, Johansen EB, Farshbaf M (2005b) Rodent models of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 57:1239-1247.
- Sagvolden T, Metzger MA, Schiorbeck HK, Rugland AL, Spinnangr I, Sagvolden G (1992) The spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model of childhood hyperactivity (ADHD): changed reactivity to reinforcers and to psychomotor stimulants. *Behav Neural Biol* 58:103-112.
- Salamone JD, Correa M (2012) The mysterious motivational functions of mesolimbic dopamine. *Neuron* 76:470-485.

- Sananbenesi F, Fischer A, Wang X, Schrick C, Neve R, Radulovic J, Tsai LH (2007) A hippocampal Cdk5 pathway regulates extinction of contextual fear. *Nat Neurosci* 10:1012-1019.
- Seeman P (1987) Dopamine receptors and the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Synapse* 1:133-152.
- Sergeant J (2000) The cognitive-energetic model: an empirical approach to attention-deficit hyperactivity disorder. *Neurosci Biobehav Rev* 24:7-12.
- Shafer RA, Levant B (1998) The D3 dopamine receptor in cellular and organismal function. *Psychopharmacology (Berl)* 135:1-16.
- Shaywitz BA, Yager RD, Klopfer JH (1976a) Selective brain dopamine depletion in developing rats: an experimental model of minimal brain dysfunction. *Science* 191:305-308.
- Shaywitz BA, Klopfer JH, Yager RD, Gordon JW (1976b) Paradoxical response to amphetamine in developing rats treated with 6-hydroxydopamine. *Nature* 261:153-155.
- Shepherd GM (2013) Corticostriatal connectivity and its role in disease. *Nat Rev Neurosci* 14:278-291.
- Shirayama Y, Chaki S (2006) Neurochemistry of the nucleus accumbens and its relevance to depression and antidepressant action in rodents. *Curr Neuropharmacol* 4:277-291.
- Smith D (2003) Cdk5 in neuroskeletal dynamics. *Neurosignals* 12:239-251.
- Solanto MV (1998) Neuropsychopharmacological mechanisms of stimulant drug action in attention-deficit hyperactivity disorder: a review and integration. *Behav Brain Res* 94:127-152.
- Solanto MV, Abikoff H, Sonuga-Barke E, Schachar R, Logan GD, Wigal T, Hechtman L, Hinshaw S, Turkel E (2001) The ecological validity of delay aversion and response inhibition as measures of impulsivity in AD/HD: a supplement to the NIMH multimodal treatment study of AD/HD. *J Abnorm Child Psychol* 29:215-228.
- Sonuga-Barke EJ (2003) The dual pathway model of AD/HD: an elaboration of neuro-developmental characteristics. *Neurosci Biobehav Rev* 27:593-604.
- Sonuga-Barke EJ (2005) Causal models of attention-deficit/hyperactivity disorder: from common simple deficits to multiple developmental pathways. *Biol Psychiatry* 57:1231-1238.
- Sonuga-Barke EJ, Sergeant JA, Nigg J, Willcutt E (2008) Executive dysfunction and delay aversion in attention deficit hyperactivity disorder: nosologic and diagnostic implications. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* 17:367-384, ix.
- Sorkina T, Hoover BR, Zahniser NR, Sorkin A (2005) Constitutive and protein kinase C-induced internalization of the dopamine transporter is mediated by a clathrin-dependent mechanism. *Traffic* 6:157-170.
- Spencer T, Biederman J, Wilens T (2004) Stimulant treatment of adult attention-deficit/hyperactivity disorder. *Psychiatr Clin North Am* 27:361-372.

- Spencer TJ, Biederman J, Madras BK, Faraone SV, Dougherty DD, Bonab AA, Fischman AJ (2005) In vivo neuroreceptor imaging in attention-deficit/hyperactivity disorder: a focus on the dopamine transporter. *Biol Psychiatry* 57:1293-1300.
- Sprich S, Biederman J, Crawford MH, Mundy E, Faraone SV (2000) Adoptive and biological families of children and adolescents with ADHD. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 39:1432-1437.
- Strang-Karlsson S, Raikkonen K, Pesonen AK, Kajantie E, Paavonen EJ, Lahti J, Hovi P, Heinonen K, Jarvenpaa AL, Eriksson JG, Andersson S (2008) Very low birth weight and behavioral symptoms of attention deficit hyperactivity disorder in young adulthood: the Helsinki study of very-low-birth-weight adults. *Am J Psychiatry* 165:1345-1353.
- Strohl MP (2011) Bradley's Bensedrine studies on children with behavioral disorders. *Yale J Biol Med* 84:27-33.
- Sulzer D (2011) How addictive drugs disrupt presynaptic dopamine neurotransmission. *Neuron* 69:628-649.
- Sulzer D, Sonders MS, Poulsen NW, Galli A (2005) Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: a review. *Prog Neurobiol* 75:406-433.
- Surmeier DJ, Song WJ, Yan Z (1996) Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons. *J Neurosci* 16:6579-6591.
- Surmeier DJ, Carrillo-Reid L, Vargas J (2011) Dopaminergic modulation of striatal neurons, circuits, and assemblies. *Neuroscience* 198:3-18.
- Surmeier DJ, Ding J, Day M, Wang Z, Shen W (2007) D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends Neurosci* 30:228-235.
- Takahashi S, Ohshima T, Cho A, Sreenath T, Iadarola MJ, Pant HC, Kim Y, Nairn AC, Brady RO, Greengard P, Kulkarni AB (2005) Increased activity of cyclin-dependent kinase 5 leads to attenuation of cocaine-mediated dopamine signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:1737-1742.
- Talge NM, Neal C, Glover V (2007) Antenatal maternal stress and long-term effects on child neurodevelopment: how and why? *J Child Psychol Psychiatry* 48:245-261.
- Tan TC, Valova VA, Malladi CS, Graham ME, Berven LA, Jupp OJ, Hansra G, McClure SJ, Sarcevic B, Boadle RA, Larsen MR, Cousin MA, Robinson PJ (2003) Cdk5 is essential for synaptic vesicle endocytosis. *Nat Cell Biol* 5:701-710.
- Taurines R, Schmitt J, Renner T, Conner AC, Warnke A, Romanos M (2010) Developmental comorbidity in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Atten Defic Hyperact Disord* 2:267-289.
- Thanos PK, Michaelides M, Benveniste H, Wang GJ, Volkow ND (2007) Effects of chronic oral methylphenidate on cocaine self-administration and striatal dopamine D2 receptors in rodents. *Pharmacol Biochem Behav* 87:426-433.

- Thapar A, Fowler T, Rice F, Scourfield J, van den Bree M, Thomas H, Harold G, Hay D (2003) Maternal smoking during pregnancy and attention deficit hyperactivity disorder symptoms in offspring. *Am J Psychiatry* 160:1985-1989.
- Tilley MR, Gu HH (2008) The effects of methylphenidate on knockin mice with a methylphenidate-resistant dopamine transporter. *J Pharmacol Exp Ther* 327:554-560.
- Tomizawa K, Ohta J, Matsushita M, Moriwaki A, Li ST, Takei K, Matsui H (2002) Cdk5/p35 regulates neurotransmitter release through phosphorylation and downregulation of P/Q-type voltage-dependent calcium channel activity. *J Neurosci* 22:2590-2597.
- Torres GE (2006) The dopamine transporter proteome. *J Neurochem* 97 Suppl 1:3-10.
- Tripp G, Alsop B (2001) Sensitivity to reward delay in children with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *J Child Psychol Psychiatry* 42:691-698.
- Tripp G, Wickens J (2012) Reinforcement, dopamine and rodent models in drug development for ADHD. *Neurotherapeutics* 9:622-634.
- Tritsch NX, Sabatini BL (2012) Dopaminergic modulation of synaptic transmission in cortex and striatum. *Neuron* 76:33-50.
- Tsai LH, Takahashi T, Caviness VS, Jr., Harlow E (1993) Activity and expression pattern of cyclin-dependent kinase 5 in the embryonic mouse nervous system. *Development* 119:1029-1040.
- Usiello A, Baik JH, Rouge-Pont F, Picetti R, Dierich A, LeMeur M, Piazza PV, Borrelli E (2000) Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature* 408:199-203.
- Valjent E, Bertran-Gonzalez J, Aubier B, Greengard P, Herve D, Girault JA (2010) Mechanisms of locomotor sensitization to drugs of abuse in a two-injection protocol. *Neuropsychopharmacology* 35:401-415.
- Vallone D, Picetti R, Borrelli E (2000) Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev* 24:125-132.
- Van den Buuse M, Jones CR, Wagner J (1992) Brain dopamine D-2 receptor mechanisms in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res Bull* 28:289-297.
- van der Kooij MA, Glennon JC (2007) Animal models concerning the role of dopamine in attention-deficit hyperactivity disorder. *Neurosci Biobehav Rev* 31:597-618.
- Van Hartesveldt C, Meyer ME, Potter TJ (1994) Ontogeny of biphasic locomotor effects of quinpirole. *Pharmacol Biochem Behav* 48:781-786.
- Vanderschuren LJ, Pierce RC (2010) Sensitization processes in drug addiction. *Curr Top Behav Neurosci* 3:179-195.
- Vanderschuren LJ, Schmidt ED, De Vries TJ, Van Moorsel CA, Tilders FJ, Schoffelmeer AN (1999) A single exposure to amphetamine is sufficient to induce long-term behavioral, neuroendocrine, and neurochemical sensitization in rats. *J Neurosci* 19:9579-9586.

- Viggiano D, Ruocco LA, Sadile AG (2003a) Dopamine phenotype and behaviour in animal models: in relation to attention deficit hyperactivity disorder. *Neurosci Biobehav Rev* 27:623-637.
- Viggiano D, Vallone D, Welzl H, Sadile AG (2002) The Naples High- and Low-Excitability rats: selective breeding, behavioral profile, morphometry, and molecular biology of the mesocortical dopamine system. *Behav Genet* 32:315-333.
- Viggiano D, Vallone D, Ruocco LA, Sadile AG (2003b) Behavioural, pharmacological, morpho-functional molecular studies reveal a hyperfunctioning mesocortical dopamine system in an animal model of attention deficit and hyperactivity disorder. *Neurosci Biobehav Rev* 27:683-689.
- Volkow ND, Ding YS, Fowler JS, Wang GJ, Logan J, Gatley JS, Dewey S, Ashby C, Liebermann J, Hitzemann R, et al. (1995) Is methylphenidate like cocaine? Studies on their pharmacokinetics and distribution in the human brain. *Arch Gen Psychiatry* 52:456-463.
- Volkow ND, Wang GJ, Kollins SH, Wigal TL, Newcorn JH, Telang F, Fowler JS, Zhu W, Logan J, Ma Y, Pradhan K, Wong C, Swanson JM (2009) Evaluating dopamine reward pathway in ADHD: clinical implications. *JAMA* 302:1084-1091.
- Voytek B, Knight RT (2010) Prefrontal cortex and basal ganglia contributions to visual working memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:18167-18172.
- Wang Y, Xu R, Sasaoka T, Tonegawa S, Kung MP, Sankoorikal EB (2000) Dopamine D2 long receptor-deficient mice display alterations in striatum-dependent functions. *J Neurosci* 20:8305-8314.
- Weihe E, Depboylu C, Schutz B, Schafer MK, Eiden LE (2006) Three types of tyrosine hydroxylase-positive CNS neurons distinguished by dopa decarboxylase and VMAT2 co-expression. *Cell Mol Neurobiol* 26:659-678.
- Whalen CK, Henker B, Ishikawa SS, Emmerson NA, Swindle R, Johnston JA (2010) Atomoxetine versus stimulants in the community treatment of children with ADHD: an electronic diary study. *J Atten Disord* 13:391-400.
- White NM, McDonald RJ (2002) Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiol Learn Mem* 77:125-184.
- Wickens JR, Hyland BI, Tripp G (2011) Animal models to guide clinical drug development in ADHD: lost in translation? *Br J Pharmacol* 164:1107-1128.
- Wiedholz LM, Owens WA, Horton RE, Feyder M, Karlsson RM, Hefner K, Sprengel R, Celikel T, Daws LC, Holmes A (2008) Mice lacking the AMPA GluR1 receptor exhibit striatal hyperdopaminergia and 'schizophrenia-related' behaviors. *Mol Psychiatry* 13:631-640.
- Willcutt EG, Doyle AE, Nigg JT, Faraone SV, Pennington BF (2005) Validity of the executive function theory of attention-deficit/hyperactivity disorder: a meta-analytic review. *Biol Psychiatry* 57:1336-1346.
- Williams SM, Goldman-Rakic PS (1998) Widespread origin of the primate mesofrontal dopamine system. *Cereb Cortex* 8:321-345.

- Wolraich M, Brown L, Brown RT, DuPaul G, Earls M, Feldman HM, Ganiats TG, Kaplanek B, Meyer B, Perrin J, Pierce K, Reiff M, Stein MT, Visser S (2011) ADHD: clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adolescents. *Pediatrics* 128:1007-1022.
- Wu J, Xiao H, Sun H, Zou L, Zhu LQ (2012) Role of dopamine receptors in ADHD: a systematic meta-analysis. *Mol Neurobiol* 45:605-620.
- Xu M, Guo Y, Vorhees CV, Zhang J (2000) Behavioral responses to cocaine and amphetamine administration in mice lacking the dopamine D1 receptor. *Brain Res* 852:198-207.
- Xu M, Moratalla R, Gold LH, Hiroi N, Koob GF, Graybiel AM, Tonegawa S (1994) Dopamine D1 receptor mutant mice are deficient in striatal expression of dynorphin and in dopamine-mediated behavioral responses. *Cell* 79:729-742.
- Xu R, Hranilovic D, Fetsko LA, Bucan M, Wang Y (2002) Dopamine D2S and D2L receptors may differentially contribute to the actions of antipsychotic and psychotic agents in mice. *Mol Psychiatry* 7:1075-1082.
- Yen YC, Anderzhanova E, Bunck M, Schuller J, Landgraf R, Wotjak CT (2013) Co-segregation of hyperactivity, active coping styles, and cognitive dysfunction in mice selectively bred for low levels of anxiety. *Front Behav Neurosci* 7:103.
- Zachariou V, Sgambato-Faure V, Sasaki T, Svenningsson P, Berton O, Fienberg AA, Nairn AC, Greengard P, Nestler EJ (2006) Phosphorylation of DARPP-32 at Threonine-34 is required for cocaine action. *Neuropsychopharmacology* 31:555-562.
- Zahm DS (2000) An integrative neuroanatomical perspective on some subcortical substrates of adaptive responding with emphasis on the nucleus accumbens. *Neurosci Biobehav Rev* 24:85-105.
- Zhou K et al. (2008) Meta-analysis of genome-wide linkage scans of attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B:1392-1398.
- Zhuang X, Oosting RS, Jones SR, Gainetdinov RR, Miller GW, Caron MG, Hen R (2001) Hyperactivity and impaired response habituation in hyperdopaminergic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:1982-1987.
- Ziv I, Melamed E, Nardi N, Luria D, Achiron A, Offen D, Barzilai A (1994) Dopamine induces apoptosis-like cell death in cultured chick sympathetic neurons--a possible novel pathogenetic mechanism in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 170:136-140.