



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral: "Estudio de los efectos de la actividad constitutiva del receptor de dopamina tipo 1 (D1R) sobre los canales de calcio operados por voltaje (Ca_v) y su rol en neuronas de la corteza prefrontal."

***Tesista:* Clara Inés McCarthy**

***Director/a:* Jesica Raingo**

***Año:* 2022**

El presente Trabajo de Tesis Doctoral fue realizado en el Laboratorio de Electrofisiología del Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE) bajo dirección de la Dra. Jesica Raingo.



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA



CONICET



Índice

Índice.....	3
Agradecimientos.....	5
Listado de abreviaturas.....	6
Resumen.....	10
Resumen en inglés.....	12
Publicaciones.....	14
Introducción.....	16
1. La corteza prefrontal (CPF).....	16
2. Los receptores de dopamina.....	21
3. Los canales de calcio operados por voltaje (C_{av}).....	28
Objetivos.....	34
Materiales y Métodos.....	37
1. Modelos experimentales.....	37
2. Drogas.....	38
3. Procedimientos y tratamientos en animales.....	39
4. Obtención de rebanadas de cerebro para registros electrofisiológicos.....	40
5. Obtención de rebanadas de cerebro para inmunohistoquímica.....	40
6. Inmunohistoquímicas y tinciones.....	41
7. Mantenimiento de cultivos celulares.....	42
8. Biología molecular.....	43
9. Expresión heteróloga.....	45
10. Electrofisiología.....	48
11. Mediciones de AMPc intracelular.....	50
12. Análisis de imágenes en células HEK293T.....	51
13. Análisis estadístico.....	52
Resultados.....	53
Capítulo 1: Estudio de las corrientes C_{av} nativas en neuronas de la corteza prefrontal y su sensibilidad a ligandos de receptores tipo-D1R.....	53
Capítulo 2: Caracterización del efecto de la actividad constitutiva de D1R sobre las corrientes $C_{av}2.2$ en un sistema de expresión heteróloga.....	74
Capítulo 3: Estudio del impacto funcional de la actividad evocada por agonista y la actividad constitutiva de los receptores tipo-D1R en neuronas piramidales de la CPFm.....	88
Discusión.....	104

Conclusiones	121
Bibliografía.....	122

Agradecimientos

Siento este escrito como la culminación de un proceso de aprendizaje y una vivencia que difícilmente olvide. Está dedicado a todas las personas que me acompañaron, me ayudaron y me escucharon durante esta etapa. Siendo como soy, este momento de expresión me pone nerviosa, así que veremos qué sale (y recuerden que el orden de los factores no altera el producto).

A Jesica, mi directora de tesis, por guiarme en este proceso, motivarme a hacer buena ciencia, fomentar mi pensamiento crítico y formarme como científica. Me enseñaste más de lo que hubiera podido pedir, y aún más.

Al grupo de trabajo del laboratorio de Electrofisiología, por generar a un ambiente de compañerismo y colaboración, condimentado con discusiones enriquecedoras. Silvia, Román, Valen, Santi, Andrea, gracias por hacerme sentir que siempre podía preguntar, pedir una mano, una opinión y por ayudarme constantemente.

A todos los becarios del IMBICE, por combinar el trabajo con risas, pavadas y a veces catarsis. Gracias Ale, Pau, Eli, Nacho, Eze. Y una mención especial a Franco por los cafecitos.

A Fede, mi compañero de ruta, por acompañarme en esta etapa y seguir sintonizado para la que viene.

A mis amigos. Gracias a Pri, Juli, Ber, Vane y Juch por ser mi núcleo. Gracias Iso, Pablo, Lis, Santi y Jime. Gracias por las historias compartidas, las juntadas, las charlas y las risas.

A Vicky, mi hermana, mi amiga, por ser espectacular.

A toda mi familia, por ser una red de contención intensa y maravillosa. Gracias por ser el cable a tierra, por todos los domingos, por todas las comidas y por todas las anécdotas. A Coca, Silvia, Sol, Agus, Mirta, Irene, Andrés y Cristina. Gracias al Nonno, a la Nonna, a Granny y a Grandpa, por sentar las bases.

En especial, gracias a mi mamá y a mi papá. Ustedes me formaron como persona y me dieron sus valores. Gracias por el apoyo incondicional y por hacerme sentir siempre acompañada y querida.

Finalmente, quiero agradecer a la UNLP, la universidad pública y gratuita que me sigue formando hasta el día de hoy.

Listado de abreviaturas

5-HT1A.....	<i>5-hydroxytryptamine receptor 1A</i>
5-HT2A.....	<i>5-hydroxytryptamine receptor 2A</i>
Å.....	Ángstrom
AC.....	adenilato ciclasa
aCSF.....	<i>artificial cerebrospinal fluid</i>
ADN.....	ácido desoxirribonucleico
ADNc.....	ácido desoxirribonucleico complementario
AgCl.....	cloruro de plata
AMPA.....	ácido α-amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
AMPc.....	adenosín monofosfato cíclico
ARNm.....	ácido ribonucleico mensajero
ATB.....	antibiótico
ATP.....	adenosin trifosfato
AUC.....	<i>area under curve</i>
BaCl ₂	cloruro de bario
BLA.....	<i>basolateral amygdala</i>
Ca ²⁺	ion calcio
CaCl ₂	cloruro de calcio
Ca _v	canales de calcio operados por voltaje
ChTx.....	<i>cholera toxin</i>
Cl ⁻	cloruro
CO ₂	dióxido de carbono
CPF.....	corteza prefrontal
CPFm.....	corteza prefrontal medial
CPZ.....	clorpromazina
CREB.....	<i>cAMP responsive element binding protein</i>
CRMP2.....	<i>collapsin response mediator protein 2</i>
CsCl.....	cloruro de cesio
CsOH.....	hidróxido de cesio
D1R.....	<i>dopamine receptor type 1</i>
D2R.....	<i>dopamine receptor type 2</i>

D3R.....	<i>dopamine receptor type 3</i>
D4R.....	<i>dopamine receptor type 4</i>
D5R.....	<i>dopamine receptor type 5</i>
DARPP-32.....	<i>dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein 32-kDa</i>
DMEM.....	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
EC ₅₀	<i>effective concentration 50</i>
EDTA.....	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EEUU.....	Estados Unidos
EGTA.....	<i>ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
EL-1.....	<i>extracellular loop 1</i>
EL-2.....	<i>extracellular loop 2</i>
EL-3.....	<i>extracellular loop 3</i>
Epac-S H187.....	<i>Exchange protein directly activated by cAMP-S H187</i>
EPSC.....	<i>excitatory postsynaptic current</i>
EPSP.....	<i>excitatory postsynaptic potential</i>
ERK.....	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
fC.....	<i>femtoCoulomb</i>
FRET.....	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>
GABA.....	<i>γ-aminobutyric acid B</i>
GFP.....	<i>green fluorescent protein</i>
GHSR.....	<i>growth hormone secretagogue receptor</i>
GPCR.....	<i>G protein coupled receptor</i>
GTP.....	guanosín trifosfato
h.....	hora
H ₂ O.....	hidróxido de hidrógeno
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno
HAL.....	haloperidol
HCl.....	ácido clorhídrico
HEPES.....	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HEK293T.....	<i>human embryonic kidney 293T</i>
HVA.....	<i>high voltage-activated</i>
IL.....	infralímbica
IL-1.....	<i>intracellular loop 1</i>
IL-2.....	<i>intracellular loop 2</i>
IL-3.....	<i>intracellular loop 3</i>

IP.....	intraperitoneal
IP ₃	<i>inositol triphosphate</i>
IPSC.....	<i>inhibitory postsynaptic current</i>
KCl.....	cloruro de potasio
kg.....	kilogramo
KH ₂ PO ₄	fosfato monopotásico
kHz.....	kilohercio
LB.....	Luria Bertani
LTP.....	<i>long lasting potentiation</i>
LVA.....	<i>low voltage-activated</i>
M.....	molar
mA.....	miliamperio
MAPK.....	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
MC4R.....	<i>melanocortin 4 receptor</i>
mEPSC.....	<i>miniature excitatory postsynaptic current</i>
mg.....	miligramo
µg.....	microgramo
MgCl ₂	cloruro de magnesio
mGluR7.....	<i>metabotropic glutamate receptor 7</i>
MgSO ₄	sulfato magnésico
min.....	minuto
mIPSC.....	<i>miniature inhibitory postsynaptic current</i>
ml.....	mililitro
µl.....	microlitro
mm.....	milímetro
mM.....	milimolar
µM.....	micromolar
MnCl ₂	cloruro de manganeso (II)
ms.....	milisegundo
µs.....	microsegundo
mV.....	milivoltio
MΩ.....	megaohm
NaCl.....	cloruro de sodio
NaHCO ₃	bicarbonato de sodio
NaH ₂ PO ₄	monofosfato de sodio

Na _v	canales de sodio operados por voltaje
ng.....	nanogramo
NiCl ₂	cloruro de níquel (II)
nm.....	nanómetro
nM.....	nanomolar
NMDA.....	N-metil-D-aspartato
O ₂	oxígeno diatómico
ORL-1.....	<i>opiod receptor-like type 1</i>
pA.....	picoamperio
pb.....	pares de bases
PBS.....	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR.....	<i>polimerase chain reaction</i>
pF.....	picofaradio
PKA.....	<i>protein kinase A</i>
PKB.....	<i>protein kinase B</i>
PL.....	prelímica
PLC.....	<i>phospholipase C</i>
pmolar.....	picomolar
RIS.....	risperidona
rpm.....	revoluciones por minuto
s.....	segundo
SA.....	sociedad anónima
SFB.....	suero fetal bovino
SLC38.....	<i>solute carrier 38</i>
SOC.....	<i>super optimal broth</i>
SV40.....	<i>simian virus 40</i>
TEA.....	trietanolamina
TTX.....	tetrodotoxina
VTA.....	<i>ventral tegmental area</i>
YFP.....	<i>yellow fluorescent protein</i>

Resumen

Las neuronas de la corteza prefrontal (CPF) tienen una abundante innervación dopaminérgica y expresan altos niveles de receptores para dopamina. Numerosas evidencias sostienen que desbalances tanto en la sensibilidad a dopamina como en el nivel de expresión del receptor de dopamina tipo 1 (D1R) en la CPF contribuyen a la fisiopatología de enfermedades psiquiátricas como esquizofrenia y al deterioro cognitivo asociado al envejecimiento. Por otro lado, mediante ensayos *in vitro* reportó que D1R posee actividad constitutiva, es decir, que adquiere una conformación activa en ausencia de agonista. Una estrategia para estudiar la actividad constitutiva de los receptores acoplados a proteína G (GPCRs) es la aplicación de agonistas inversos, ligandos que reducen su señalización en ausencia de agonista. En particular para el D1R no se conocen aún agonistas inversos endógenos, pero se descubrió mediante ensayos *in vitro* que distintos fármacos antipsicóticos, originalmente descritos como antagonistas del receptor D2R, funcionan como agonistas inversos de los receptores tipo-D1R (D1R y D5R). Los canales de calcio operados por voltaje (Ca_v) son proteínas que controlan el ingreso de calcio extracelular y son críticas para muchas funciones neuronales, por lo que se encuentran estrictamente reguladas. En general, se observó que muchos Ca_v son particularmente sensibles tanto a la actividad evocada por agonista como a la constitutiva de los GPCRs. En este sentido, se reportó que D1R interacciona físicamente con el subtipo $Ca_v2.2$, favoreciendo su tráfico hacia la membrana postsináptica de neuronas piramidales presentes en la capa 5/6 de la CPF medial (CPFm). En este trabajo de tesis estudiamos el efecto de la actividad constitutiva de los receptores tipo-D1R en las conductancias Ca_v nativas y su impacto funcional en neuronas piramidales de la CPFm de ratón. Utilizamos clorpromazina, un antipsicótico y agonista inverso de los receptores tipo-D1R, administrada *in vitro* e *in vivo* para modular la actividad constitutiva de estos receptores. Acompañamos los experimentos en neuronas *ex vivo* de la CPFm con ensayos en un sistema de expresión heteróloga para evaluar la sensibilidad de cada subtipo de Ca_v a la actividad basal de D1R, el receptor tipo-D1R más abundante en la CPFm. En el primer capítulo de resultados, mostramos que clorpromazina reduce las corrientes Ca_v evocadas a altos voltajes (HVA) en neuronas piramidales de la CPFm, mediante dos mecanismos diferentes: uno que involucra a la actividad basal de los tipo-D1R y reduce las corrientes $Ca_v2.2$, y otro que inhibe las corrientes Ca_v1 en forma independiente de la actividad constitutiva de los tipo-D1R. En el segundo capítulo de resultados, mostramos que la coexpresión de D1R tiene un efecto dual sobre las corrientes $Ca_v2.2$ recombinantes. Por un lado, la actividad

constitutiva de D1R aumenta la amplitud de las corrientes $Ca_v2.2$ como consecuencia de una mayor densidad de canales funcionales en la membrana plasmática, y este efecto dependería tanto de la interacción física entre el *loop* 2 de D1R y la región C-terminal de $Ca_v2.2$, así como de la presencia de la proteína Gs activa en forma crónica. Por otro lado, demostramos que el efecto inhibitorio sobre los $Ca_v2.2$ en células que expresan elevadas concentraciones de D1R no se debe a su actividad constitutiva y planteamos la posibilidad de que esté relacionado a la formación de dímeros entre receptores D1R. Finalmente, en el tercer capítulo de resultados mostramos que la actividad evocada por agonista y la actividad constitutiva de D1R presentan efectos opuestos sobre las corrientes $Ca_v2.2$. Encontramos que modular la actividad constitutiva de los receptores tipo-D1R *in vivo* redujo la sensibilidad de las corrientes Ca_v HVA nativas al agonista específico tipo-D1R, SKF38393. Este resultado sugiere que el grado de actividad constitutiva de los tipo-D1R influye sobre los efectos de su actividad evocada, aunque no logramos observar estas diferencias en células HEK293T transfectadas. Adicionalmente, demostramos que clorpromazina reduce en forma crónica las corrientes postsinápticas excitatorias, mientras que SKF38393 las facilita en forma aguda; y observamos una tendencia a que clorpromazina aumente las corrientes postsinápticas inhibitorias, generando un desbalance excitatorio/inhibitorio en las neuronas piramidales de la CPFm. En conjunto, nuestros datos nos permiten proponer que la actividad constitutiva de los receptores tipo-D1R tiene un rol fisiológico en la CPFm, aumentando la expresión de $Ca_v2.2$ en la postsinapsis y favoreciendo un mayor ingreso de calcio que podría impactar en la neurotransmisión excitatoria.

Resumen en inglés

Prefrontal cortex (PFC) neurons receive an abundant dopaminergic innervation and express high levels of dopamine receptors. Alterations in dopamine sensitivity and in the dopamine receptor type 1 (D1R) expression levels in the PFC contribute to the physiopathology of psychiatric disorders such as schizophrenia. Meanwhile, *in vitro* assays have proven that D1R exhibits constitutive activity, meaning that it acquires an active conformation in the absence of agonists. A useful strategy to study the constitutive activity of G protein-coupled receptors (GPCR) is the application of inverse agonists, which reduce their basal signaling. Endogenous inverse agonists have not yet been identified for D1R, but it was proven through *in vitro* studies that several antipsychotic drugs act as inverse agonists of the D1R-like receptors (D1R and D5R), in addition to their classical antagonist action on D2R receptors. Moreover, voltage-gated calcium channels (Ca_v) are tightly regulated proteins that control calcium entry and are crucial for many neuronal functions. Many Ca_v subtypes are sensitive to GPCR constitutive activity. In this regard, it was reported that D1R physically interacts with the $Ca_v2.2$ subtype, increasing channel expression in postsynaptic sites of layer 5/6 pyramidal neurons from the medial PFC (mPFC). In this work, we studied the effects of D1R-like constitutive activity on native Ca_v currents and the functional impact of this modulation on pyramidal neurons from the mouse mPFC. We performed *in vitro* and *in vivo* administrations of chlorpromazine, an antipsychotic drug and D1R-like inverse agonist. We conducted experiments in *ex vivo* mPFC neurons and in a heterologous expression system in order to assess the sensitivity of different Ca_v subtypes to the constitutive activity of D1R, the most abundant D1R-like receptor in the mouse brain. In the first results chapter, we show that chlorpromazine reduces high-voltage activated (HVA) Ca_v currents in pyramidal neurons from the mPFC through two different mechanisms: one that involves D1R-like constitutive activity and affects the $Ca_v2.2$ subtype, and the other that is independent of D1R activity and reduces Ca_v1 currents. In the second results chapter, we show that D1R co-expression has a dual effect on recombinant $Ca_v2.2$ currents. First, D1R constitutive activity enhances $Ca_v2.2$ current amplitude as a consequence of an increased channel density in the plasma membrane. This stimulatory effect requires the physical interaction between D1R and $Ca_v2.2$, as well as a chronically active G_s protein. In contrast, we found an inhibitory effect of D1R expressed at high levels on $Ca_v2.2$ currents and that this modulation is not related to D1R constitutive activity. Finally, in the third results chapter, we show that D1R agonist-evoked and constitutive activities have opposite effects on $Ca_v2.2$ currents. We found that reducing

D1R constitutive activity *in vivo* produced a lower sensitivity of Ca_v HVA currents to a D1R-like agonist, SKF38393, compared to control mice. This result suggests that the level of basal activity of D1R impacts on the effects of its agonist-evoked activity, although we did not observe these changes in transfected HEK293T cells. Additionally, we demonstrated that chlorpromazine chronically reduces excitatory postsynaptic currents, while they are potentiated by SKF38393 acute application. We also found a statistical tendency for chlorpromazine increase of inhibitory postsynaptic currents, which contributed to an excitation/inhibition imbalance in pyramidal neurons from the mPFC. Overall, our results allow us to propose that D1R-like constitutive activity has a physiological role in the mPFC, increasing $Ca_v2.2$ postsynaptic expression and therefore favoring a larger calcium entry that could impact on excitatory neurotransmission.

Publicaciones

Los resultados de esta tesis doctoral forman parte de las siguientes publicaciones:

Constitutive activity of dopamine receptor type 1 (D1R) increases Ca_v2.2 currents in PFC neurons.

McCarthy CI, Chou-Freed C, Rodriguez SS, Yaneff A, Davio C & Raingo J.

Journal of General Physiology. 2020. <https://doi.org/10.1085/jgp.201912492>

Chlorpromazine, an inverse agonist of D1R-like, differentially targets voltage-gated calcium channels (Ca_v) subtypes in PFCm neurons.

McCarthy CI, Mustafá ER, Cornejo MP, Yaneff A, Rodriguez SS, Perelló M & Raingo J.

En revisión en *Molecular Neurobiology*.

Preprint. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1862821/v1>

Trabajos científicos adicionales en colaboración con otros proyectos realizados en el transcurso de esta tesis doctoral:

Mouse models for V103I and I251L gain of function variants of the human MC4R display decreased adiposity and are not protected from a hypercaloric diet.

Rojo D, **McCarthy CI**, Raingo J & Rubinstein M.

Molecular Metabolism, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101077>

ACE2 internalization induced by a SARS-CoV-2 recombinant protein is modulated by angiotensin II type 1 and bradykinin 2 receptors.

Portales AE, Mustafá ER, **McCarthy CI**, Cornejo MP, Couto PM, Gironacci MM, Caramelo JJ, Perelló M & Raingo J.

Life Sciences, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.120284>

Functional alterations of two novel MC4R mutations found in Argentinian pediatric patients with early onset obesity.

Fernández E, **McCarthy CI**, Cerviño RH, Rodríguez SS, Yaneff A, Hernández J, Garrido V, Di Rocco F & Raingo J.

En revisión en *Molecular and Cellular Endocrinology*.

Preprint. <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4031362>

Constitutive activity of the dopamine receptor D5R, highly expressed in CA1 hippocampal neurons, selectively reduces Ca_v3.2 and Ca_v3.3 currents.

Mustafá ER, **McCarthy CI**, Portales AE, Cordisco Gonzalez S, Rodriguez SS & Raingo J.

En revisión en *British Journal of Pharmacology*.

Introducción

1. La corteza prefrontal (CPF)

Anatomía y función de la CPF

La CPF tiene un rol central en procesos cognitivos complejos, como la atención selectiva, la memoria de trabajo y la toma de decisiones (Bicks et al., 2015; Jones, 2002; Ko, 2017). Además, está fuertemente implicada en procesos emocionales, sociales, motivacionales y perceptuales (Carlén, 2017). Muchas, si no todas, de estas funciones de la CPF se encuentran moduladas por dopamina (Ranganath & Jacob, 2016). Las neuronas de la CPF tienen una abundante inervación dopaminérgica y expresan altos niveles de receptores para dopamina (Bittar & Labonté, 2021). Numerosas evidencias sostienen que desbalances tanto en la sensibilidad a dopamina como en el nivel de expresión del receptor de dopamina tipo 1 (D1R) en la CPF y otras áreas cerebrales contribuyen a la fisiopatología de enfermedades psiquiátricas como esquizofrenia y al deterioro cognitivo asociado al envejecimiento (Herold et al., 2012; McNab et al., 2009; Okubo et al., 1997; Wang et al., 1998). En este sentido, es importante investigar los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la función fisiológica de los receptores de dopamina y en sus desajustes en estados patológicos, que en última instancia controlan el comportamiento (Ranganath & Jacob, 2016).

La CPF es la región cortical más anterior del lóbulo frontal presente en el cerebro de mamíferos (Fuster, 2001). Fue definida hace más de 70 años como la región de la corteza que recibe proyecciones del núcleo talámico mediodorsal (Rose & Woolsey, 1949), una delimitación que aún se encuentra vigente (Carlén, 2017). Es interesante que esta manera de definir la CPF permitió proponer por primera vez que todos los mamíferos, incluidos los roedores, poseen un área cortical homóloga a la CPF de primates (Uylings et al., 2003). Sin embargo, actualmente se sabe que el tálamo mediodorsal proyecta a áreas adicionales fuera de la CPF y que la misma recibe proyecciones de otros núcleos talámicos (Oh et al., 2014). En el cerebro de ratones, se propuso que la CPF medial (CPFm) presenta 2 regiones homólogas a la CPF humana: un área dorsal, llamada región prelímbica, y una región ventral, llamada infralímbica (Gass & Chandler, 2013). Adicionalmente, algunos autores incluyen al área anterior cingulada y al área motora secundaria dentro de la CPFm murina (Carlén, 2017; Van De Werd & Uylings, 2014). La CPFm de ratones recibe inervaciones provenientes de otras regiones corticales, el hipocampo ventral, el área ventral tegmental (VTA, del inglés

ventral tegmental area), la amígdala basolateral (BLA, del inglés *basolateral amygdala*), el claustró y otros núcleos talámicos, además del mediodorsal (Anastasiades & Carter, 2021). Entre estas, el VTA es la mayor fuente de inervaciones dopaminérgicas hacia la CPFm murina (Ranganath & Jacob, 2016). A su vez, la CPFm de ratones emite proyecciones hacia otras regiones corticales y regiones subcorticales, como la BLA, el cuerpo estriado, el claustró, el hipotálamo y el tálamo, permitiendo que la CPFm modifique su actividad y ejecute controles *top-down* del comportamiento.

En cuanto a su citoarquitectura, la CPF está organizada en las capas horizontales características de la neocorteza cerebral, numeradas del 1 al 6 desde una posición más medial a lateral, como se observa en la Figura 1. En ratones, la CPF carece de capa 4, una región receptora de aferencias característica del cerebro de primates, y en cambio las aferencias se distribuyen a lo largo de las capas 1 a 6 (Anastasiades & Carter, 2021). Las aferencias de larga distancia, que pueden ser glutamatérgicas, dopaminérgicas, serotoninérgicas o adrenérgicas dependiendo de su origen (Bittar & Labonté, 2021), contactan y activan directamente subpoblaciones neuronales específicas excitatorias e inhibitorias, y esto activa a su vez comunicaciones locales. Existen dos poblaciones neuronales bien diferenciadas: las neuronas piramidales excitatorias que producen y liberan glutamato (80-90%) y las interneuronas inhibitorias (10-20%) (Xu et al., 2019). Las interneuronas están presentes en todas las capas corticales, liberan el neurotransmisor ácido γ -aminobutírico (GABA, del inglés *γ -aminobutyric acid*) y son las encargadas de modular la inhibición local sobre las piramidales (Kawaguchi & Kubota, 1997). Las neuronas piramidales reciben las aferencias provenientes de otras regiones cerebrales, realizan complejos procesos de integración y emiten proyecciones excitatorias. Sus somas triangulares se ubican en las capas 2/3, 5 y 6 y sus dendritas apicales se extienden hacia las capas más superficiales (Yang et al., 1996). Estas tienen 2 dominios, uno basal y otro apical, están altamente ramificadas y contienen miles de sinapsis producidas por contactos axonales en sus espinas dendríticas. En la base del soma se generan dendritas adicionales que se dirigen transversalmente o hacia capas más profundas y se genera un axón que da origen a conexiones locales o de larga distancia (Wang et al., 2006). Generalmente, los somas y axones de las neuronas piramidales reciben las entradas inhibitorias GABAérgicas, mientras que la mayoría de las entradas excitatorias llegan a nivel de las dendritas (Spruston, 2008). Se ha observado que las dendritas proximales al soma reciben las entradas excitatorias locales (colaterales en el mismo área o área adyacente), mientras que las dendritas distales reciben las entradas sinápticas de larga distancia (Dembrow & Johnston, 2014; Douglas & Martin, 2004). Esta organización

topográfica y la variedad de morfologías de las dendritas son aspectos importantes a tener en cuenta para estudiar la integración de las entradas sinápticas de diferentes dominios (Cauller & Connors, 1994; Spruston, 2008) y el impacto funcional de neuromoduladores como dopamina.

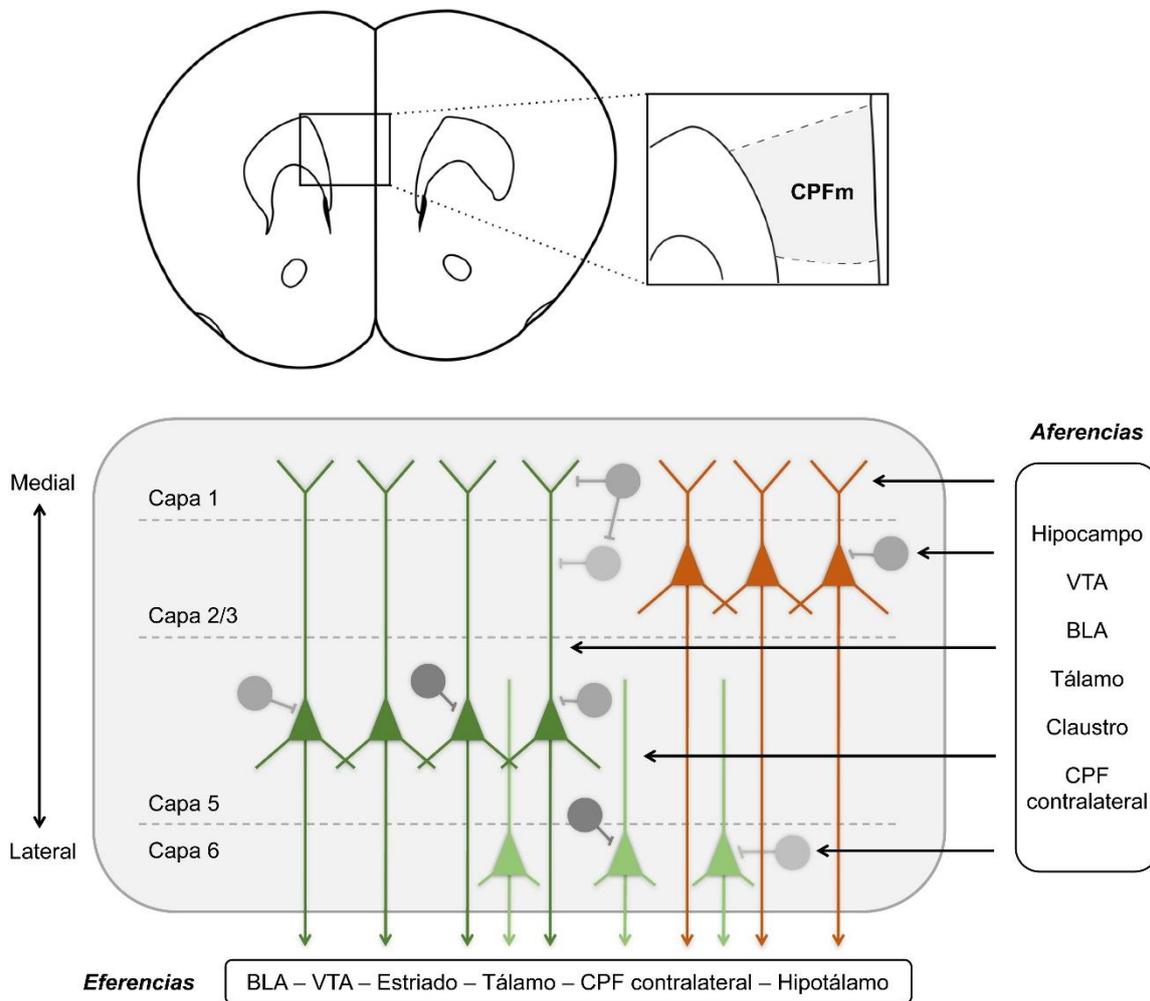


Figura 1. Ubicación y citoarquitectura de la CPFm. *Panel superior:* representación esquemática de una sección coronal de cerebro de ratón (Bregma +1,70 mm), indicando la ubicación de la CPFm (gris). *Panel inferior:* representación esquemática de la organización celular en la CPFm. La CPFm está organizada en capas, numeradas de 1 (en posición medial) a 6 (lateral). Las neuronas piramidales glutamatergicas se disponen en las capas 2/3 (naranja), 5 (verde oscuro) y 6 (verde claro), mientras que las interneuronas GABAérgicas se distribuyen a lo largo de las capas 1 a 6 (gris). La CPFm recibe aferencias provenientes del hipocampo, el área tegmental ventral (VTA), la amígdala basolateral (BLA), el tálamo, el claustró y la CPF contralateral, entre otras, que contactan con neuronas piramidales e interneuronas desde la capa 1 hasta la 6. Las neuronas piramidales emiten eferencias hacia la BLA, el VTA, el cuerpo estriado, el tálamo, la CPF contralateral y el hipotálamo, entre otras regiones.

Actividad sináptica e integración de señales en neuronas piramidales

La sinapsis es la unidad funcional que permite la comunicación entre neuronas. Es una estructura asimétrica muy especializada en donde una terminal presináptica libera neurotransmisores al espacio intersináptico, los cuales son captados por receptores presentes en la neurona postsináptica (Südhof, 2014; Südhof & Malenka, 2008). De manera simplificada, la llegada de los potenciales de acción a la terminal sináptica activa a los canales de calcio operados por voltaje (Ca_v) presinápticos, lo que desencadena una liberación masiva de neurotransmisores (Stanley, 2016). La unión de los neurotransmisores a sus receptores específicos ionotrópicos genera corrientes postsinápticas excitatorias despolarizantes (EPSC, del inglés *excitatory postsynaptic current*) o bien corrientes postsinápticas inhibitorias hiperpolarizantes (IPSC, del inglés *inhibitory postsynaptic current*) (Kennedy, 2000). Además, la liberación de neurotransmisores ocurre de manera espontánea e independiente de la llegada de potenciales de acción, generando pequeñas corrientes postsinápticas conocidas como corrientes miniatura excitatorias (mEPSC) o inhibitorias (mIPSC) (Kavalali, 2015). La membrana postsináptica posee típicamente dos receptores para glutamato que generan las EPSC: los receptores AMPA (del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico), que permean sodio y potasio al unirse a su ligando, y los receptores NMDA (del N-metil-D-aspartato), que permiten adicionalmente el ingreso de calcio cuando se combina la unión de glutamato con potenciales de membrana despolarizados que liberan al receptor de su bloqueo por magnesio (Kennedy, 2000). Es por ello que los niveles de despolarización necesarios para reclutar a los receptores NMDA son más positivos en comparación con los receptores AMPA. Por otro lado, en la membrana postsináptica también se encuentran receptores postsinápticos inhibitorios que típicamente son los receptores para el neurotransmisor GABA, cuya apertura permite el ingreso de aniones Cl^- al citoplasma y genera las IPSC (Moss & Smart, 2001). Así, la integración de todas las EPSC y las IPSC que se producen en una neurona determina la generación de potenciales de acción.

La integración de estas entradas sinápticas depende en gran medida del factor temporal y de su ubicación en la neurona postsináptica. Por ejemplo, se asume que las sinapsis excitatorias distantes al soma que contactan con las dendritas apicales tendrán una menor influencia sobre la iniciación del potencial de acción en el axón, en comparación con las sinapsis en dendritas basales (Larkum et al., 2004; Spruston, 2008). No obstante, las sinapsis distales pueden cooperar con entradas sinápticas más proximales, activando potenciales dendríticos locales. Otro aspecto importante para la integración espacial y temporal de las sinapsis es la actividad de canales iónicos

operados por voltaje. En las dendritas, la función de los canales de sodio, de calcio y de potasio determina la propagación de potenciales dendríticos y la propagación retrógrada de potenciales de acción (Huguenard et al., 1989; Spruston, 2008; Waters et al., 2003; Yi et al., 2019). Los potenciales dendríticos de sodio son rápidos, mientras que los potenciales de calcio son más lentos y de mayor duración (Heng et al., 2011; Kisilevsky et al., 2008) y ambos son inducidos por una activación sináptica fuerte o estimulación de alta frecuencia (Spruston, 2008). La activación de receptores NMDA también genera potenciales dendríticos, aunque estos están limitados espacialmente a las regiones donde ocurre la liberación de glutamato (Gao et al., 2021). La combinación de estos potenciales con propiedades cinéticas y alcances espaciales diferentes determina la propagación de la señal hacia el soma. Estos procesos de integración de señales son particularmente importantes en la CPF donde llegan múltiples aferencias de corta y larga distancia, se activan circuitos locales y se emiten proyecciones que controlan la actividad de otras regiones cerebrales.

Asimismo, en las neuronas de la CPF se pueden inducir distintos procesos de plasticidad dependientes de calcio, muchas veces regulados por neuromoduladores. Los potenciales dendríticos en las neuronas piramidales son necesarios para la inducción de procesos de plasticidad sináptica, como por ejemplo la potenciación a largo plazo (LTP del inglés *long term potentiation*) (Remy & Spruston, 2007). La entrada de calcio a través de los receptores NMDA y otros canales de calcio, como los Ca_v , activa cascadas de señalización intracelular claves para el funcionamiento de la sinapsis (Flavell & Greenberg, 2008). Por ejemplo, el aumento en el calcio intracelular puede activar cascadas de fosforilación que aumentan la densidad de receptores AMPA en la membrana postsináptica, un rasgo asociado a la “fuerza” de esa sinapsis (Spruston, 2008). Además, se ha reportado que los niveles de expresión de NMDA son modulables por distintos procesos de plasticidad dependientes de calcio (Goto et al., 2010). En este sentido, se ha postulado que los LTP regulan la forma en que los circuitos de la CPF procesan y almacenan información temporalmente durante ejercicios de memoria a corto plazo. (Chen et al., 2007). Por otro lado, los neuromoduladores, como dopamina, serotonina, noradrenalina y acetilcolina, pueden modificar la función de las neuronas piramidales. Las cascadas de señalización activadas por estos neuromoduladores actúan sobre los receptores de glutamato y GABA y sobre otros canales activados por voltaje afectando varias funciones celulares, como la fuerza sináptica, los procesos de plasticidad, la actividad transcripcional, el patrón de disparo y la excitabilidad dendrítica (Bazzari & Parri, 2019). Por ejemplo, se reportó que la activación de los receptores tipo-D1R por dopamina o agonistas sintéticos es necesaria para el mantenimiento de los

LTP en la CPFm de ratón (Gurden et al., 2000; Huang et al., 2004; Otani et al., 2015). Los efectos de la neuromodulación pueden estar restringidos espacialmente como resultado de diferencias en la innervación, la distribución de receptores y la distribución de proteínas blanco en los distintos compartimientos dendríticos (Spruston, 2008).

2. Los receptores de dopamina

Estructura y función de los receptores de dopamina

Los receptores de dopamina pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G (GPCR, del inglés *G protein coupled receptor*) y se los ubica particularmente en la clase A junto a otros receptores aminérgicos (Beaulieu et al., 2019). Los GPCRs son el grupo más diverso y amplio de proteínas transmembrana conocidas y funcionan como sensores de señales externas que, mediante su acople a proteínas G, transmiten información al medio intracelular. Al igual que para otros GPCRs, la estructura general de los receptores de dopamina consta de un segmento N-terminal extracelular, un segmento C-terminal intracelular y siete dominios hélice transmembrana unidos por tres segmentos extracelulares (EL-1, EL-2, EL-3, del inglés *extracellular loop*) y tres segmentos intracelulares (IL-1, IL-2, IL-3, del inglés *intracellular loop*) (Beaulieu et al., 2019) (Figura 2). En mamíferos, se identificaron 5 genes para receptores de dopamina y se los agrupó en dos categorías de acuerdo a su similitud de secuencias, farmacología y especificidad de acoplamiento a proteína G: los tipo-D1R (D1R y D5R) y los tipo-D2R (D2R, D3R y D4R) (Beaulieu et al., 2015; Yamamoto et al., 2015). Estos receptores están ampliamente expresados en el sistema nervioso central y en regiones periféricas como vasos sanguíneos, riñones, corazón, retina y glándulas adrenales (Klein et al., 2019).

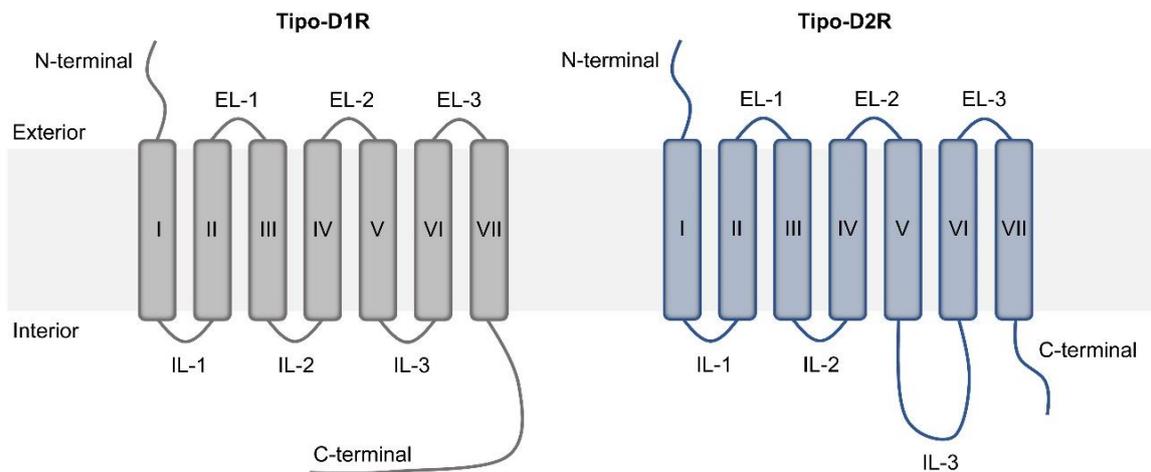


Figura 2. Representación esquemática de la estructura de los receptores de dopamina tipo-D1R (izquierda) y tipo-D2R (derecha). Los segmentos transmembrana (I a VIII) se encuentran unidos mediante los segmentos extracelulares 1 a 3 (EL, del inglés *extracellular loop*) y mediante los segmentos intracelulares 1 a 3 (IL, del inglés *intracellular loop*). Adaptado de (Pandey et al., 2013).

Los mecanismos a través de los cuales los receptores de dopamina cumplen sus funciones fisiológicas son muy variados, incluyendo cascadas activadas por proteína G, así como también muchos mecanismos que son independientes de proteína G. Las proteínas G son complejos heterotriméricos, compuestos por la proteína $G\alpha$ y el dímero $G\beta\gamma$, que se activan y se disocian permitiendo que las subunidades lleven a cabo funciones fisiológicas específicas. Clásicamente, los receptores tipo-D1R se acoplan a la proteína G_s , activando a la enzima adenilato ciclasa (AC) y generando un aumento en la concentración del segundo mensajero adenosin monofosfato cíclico (AMPC). En células del neostriado donde la proteína G_s se expresa en baja cantidad, la estimulación de la AC por los receptores tipo-D1R se produce a través de la proteína Golf (Zhuang et al., 2000). Por el contrario, los receptores tipo-D2R se acoplan a la proteína G_i/o e inhiben la producción de AMPC (Price et al., 1999). En ambos casos, la modulación de la concentración de AMPC regula la actividad de la proteína quinasa A (PKA, del inglés *protein kinase A*) (Missale et al., 1998). Se describieron muchos blancos intracelulares de la enzima PKA, dentro de los cuales podemos destacar a los receptores de glutamato, receptores GABAérgicos, canales Ca_v , canales de potasio, factores de transcripción CREB (del inglés, *cAMP responsive element binding protein*) y fosfoproteínas reguladas por dopamina y AMPC de 32 kDa (DARPP-32, del inglés *dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein 32-kDa*) (Klein et al., 2019). Aunque la actividad de los receptores de dopamina muchas veces se describe como su efecto en

la producción de AMPc, también puede regular otras vías de transducción de señales. Por ejemplo, se reportó que en determinadas circunstancias los receptores de dopamina pueden regular la vía de señalización del inositol trifosfato (IP₃, del inglés *inositol triphosphate*) (Beaulieu et al., 2015). En el caso de los receptores tipo-D1R, este efecto se atribuye a la activación de la proteína G α q que estimula la actividad de la fosfolipasa C (PLC, del inglés *phospholipase C*) (Medvedev et al., 2013), mientras que los receptores tipo-D2R estimulan la actividad de la PLC y la producción de IP₃ a través de la proteína G β γ (Hernández-López et al., 2000).

Por otro lado, los receptores de dopamina pueden tener efectos independientes de la activación de proteínas G. En este sentido, ante la presencia prolongada de dopamina estos receptores reclutan proteínas β -arrestina que interrumpen la activación de proteínas G y promueven la internalización del receptor, un proceso ampliamente estudiado para muchos GPCRs y conocido como desensibilización (Del'Guidice et al., 2011; Ferguson et al., 1998; Rajagopal & Shenoy, 2018). Además, se observó que la unión de β -arrestina 2 a los receptores de dopamina puede activar vías de señalización intracelular tales como la de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK, del inglés *mitogen-activated protein kinases*), las proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK, del inglés *extracellular signal-regulated kinases*) y la proteína quinasa B (PKB, del inglés *protein kinase B*) (Del'Guidice et al., 2011). Un mecanismo de acción independiente de proteína G que parece ser importante para estos receptores es la modulación de proteínas blanco por interacción física, un mecanismo descrito para muchos GPCRs (Zamponi et al., 2015). Se encontró que D1R y D2R forman complejos con algunos canales iónicos, enzimas y otros receptores, y así modifican su actividad o disponibilidad en la membrana plasmática (Blom et al., 2012; Hazelwood et al., 2008; Kisilevsky et al., 2008; Kisilevsky & Zamponi, 2008a; Ladepeche et al., 2013; Wang et al., 2017a). Por ejemplo, se reportó que D1R y D2R interactúan físicamente con Ca_v2.2, aumentando su expresión en la membrana plasmática, y que la presencia prolongada de dopamina promueve la cointernalización de estos complejos (Kisilevsky et al., 2008; Kisilevsky & Zamponi, 2008a). Todos estos mecanismos de acción pueden verse modificados por la dimerización u oligomerización de los receptores de dopamina, ya sea con el propio subtipo de receptor (homómeros), con otro subtipo de receptor de dopamina o con otros GPCRs (heterómeros) (Gurevich & Gurevich, 2008; Perreault et al., 2014). Un ejemplo muy explorado es la heterodimerización de D1R y D2R, en donde la activación por dopamina activa a la proteína G α q, en contraste con la actividad clásica de cada GPCR aislado (Vekshina et al., 2017). Por otro lado, la heterodimerización entre D2R y el receptor de ghrelina (GHSR, del inglés *growth hormone secretagogue receptor*)

reduce el efecto de la activación de D2R por dopamina sobre corrientes Ca_v en neuronas hipotalámicas (Cordisco Gonzalez et al., 2020). Así, la formación de homo o heterodímeros puede cambiar la vía de señalización evocada por agonistas o puede generar interacciones alostéricas positivas o negativas entre los receptores y modificar su sensibilidad a ligandos (Casadó-Anguera et al., 2019), añadiendo un grado de complejidad adicional a la hora de estudiar las consecuencias de la activación de los receptores de dopamina.

Particularmente para los receptores tipo-D1R, se demostró mediante ensayos bioquímicos y de mutagénesis *in vitro* que activan a la proteína Gs en forma independiente de su unión a agonistas, aumentando los niveles basales de AMPc hasta alcanzar ~30% de su activación máxima evocada por dopamina (Charpentier et al., 1996; Plouffe et al., 2010; Tiberi & Caron, 1994). En este sentido, el modelo de activación de los GPCRs de múltiples estados propone que una conformación inactiva puede isomerizar a una conformación activa en ausencia de agonista, una propiedad que da origen a la actividad constitutiva (Bennett et al., 2013). La primera evidencia de actividad constitutiva fue reportada para el receptor δ -opioide (Koski et al., 1982) y, desde entonces, se confirmó este tipo de activación para más de 60 GPCRs (Beinborn et al., 2004). Además, este modelo de activación de los GPCRs plantea que cada ligando reconoce y estabiliza conformaciones específicas de un determinado GPCR, otorgando así efectos biológicos únicos y específicos para cada interacción en un proceso conocido como selección conformacional (Kenakin, 2012). Por un lado, los agonistas son ligandos que se unen y estabilizan a estados conformacionales activos, mientras que los agonistas inversos se unen y estabilizan a estados conformacionales inactivos, reduciendo la señalización basal (Milligan, 2003). Otros ligandos, llamados antagonistas neutros, no alteran el equilibrio entre estados activos e inactivos, sino que bloquean los efectos de agonistas y agonistas inversos (Seifert & Wenzel-Seifert, 2002). Una estrategia para estudiar la actividad constitutiva de un GPCR es la aplicación de agonistas inversos (Kenakin, 2004) y se han identificado agonistas inversos para la mayoría (~75%) de los GPCRs constitutivamente activos (Seifert & Wenzel-Seifert, 2002). Notoriamente, se descubrieron dos agonistas inversos endógenos: la proteína relacionada con el agutí (AgRP, del inglés *Agouti-related peptide*) para el receptor de melanocortina 4 (MC4R, del inglés *melanocortin 4 receptor*) (Nijenhuis et al., 2001) y el péptido antimicrobiano expresado en hígado 2 (LEAP-2, del inglés *liver-expressed antimicrobial peptide 2*) para el GHSR (M'Kadmi et al., 2018). Sin embargo, la mayoría de estos ligandos son drogas sintéticas y algunos son fármacos comúnmente utilizados en el tratamiento de desórdenes psiquiátricos (Seifert & Wenzel-Seifert, 2002). En

particular, utilizando sistemas *in vitro* se demostró que muchos fármacos antipsicóticos funcionan como agonistas inversos de receptores tipo-D1R (Cai et al., 1999; Zhang et al., 2014).

Los receptores de dopamina son proteínas blanco establecidas en la farmacología clínica para tratar muchos desórdenes psiquiátricos como esquizofrenia, enfermedad de Parkinson, desorden bipolar, depresión, desorden de déficit de atención, adicciones y espectro autista, y otras condiciones clínicas como hiperprolactinemia, tumores pituitarios, gastroparesia e hipertensión (Beaulieu et al., 2015). Sin embargo, una dificultad en el desarrollo de fármacos específicos para los receptores de dopamina es su elevada homología, lo cual resulta en que muchos ligandos se unan a múltiples subtipos de receptores de dopamina e incluso a otros GPCRs aminérgicos (Zhuang et al., 2021). Aunque algunos ligandos discriminan fácilmente entre receptores tipo-D1R y tipo-D2R, no logran diferenciar claramente entre los miembros de una misma subfamilia (Vallone et al., 2000). En particular para los tipo-D1R, no se han identificado ni sintetizado ligandos selectivos que permitan diferenciar entre D1R y D5R (Crunkhorn, 2021; Nichols, 2010). Un avance que puede contribuir a la identificación de drogas más específicas es la reciente cristalización de la estructura de los receptores D1R (Teng et al., 2022; Zhuang et al., 2021), D2R (Fan et al., 2020; Wang et al., 2018; Yin et al., 2020), D3R (Chien et al., 2010) y D4R (Wang et al., 2017b). En estos trabajos se resolvió la estructura cercana al nivel atómico (~3 Å) de los complejos de señalización de estos receptores en presencia de agonistas y antagonistas. El conocimiento de estas estructuras y los sitios de unión a ligandos provee información para comprender las bases moleculares de la señalización de estos receptores y para el diseño racional de ligandos específicos con fines terapéuticos (Jones-Tabah et al., 2021; Zhuang et al., 2021).

Receptores tipo-D1R en el cerebro fisiológico y patológico

D1R es el receptor de dopamina más abundante en el cerebro humano y murino, y está ampliamente expresado en regiones como el cuerpo estriado, la corteza, el tálamo, la amígdala y la sustancia negra (Bergson et al., 1995; Green et al., 2020; Hall et al., 1994; Mansour et al., 1990; Meador-Woodruff et al., 1991). A nivel subcelular, se considera que los D1R se localizan principalmente en sitios post- y perisinápticos, aunque también se los ha encontrado en la presinapsis (Bergson et al., 1995). La actividad de D1R en el cerebro está implicada en la regulación del comportamiento locomotor, el sistema de recompensa, estados motivacionales y procesos cognitivos,

entre otros (Jones-Tabah et al., 2021). En este sentido, los ratones transgénicos deficientes para D1R son animales viables, aunque presentan retrasos en su desarrollo postnatal, baja tasa de supervivencia después del destete y un tamaño corporal reducido en el adulto (Glickstein & Schmauss, 2001). Esta dificultad para prosperar en su desarrollo se puede compensar si se provee a los animales de alimento palatable y de fácil acceso, lo que sugiere que podría estar relacionada a déficits en el control motor (Holmes et al., 2004). Los ratones deficientes para D1R presentan déficits en aprendizaje y memoria (Glickstein & Schmauss, 2001) y alteraciones severas en la actividad locomotora, mostrando un aumento de la actividad locomotora basal pero dificultades para realizar movimientos finos y controlados (Holmes et al., 2004; Okubo et al., 2018). Por otro lado, utilizando ratones transgénicos deficientes para D1R o para D5R y mediante cuantificaciones de los niveles de ARNm y proteína de estos receptores, se determinó que la distribución de D5R en el cerebro es menos abundante y más acotada en comparación con D1R (Bergson et al., 1995; Meador-Woodruff et al., 1992; Montague et al., 2001). Sin embargo, como mencionamos previamente, al día de hoy no existen ligandos específicos que logren diferenciar entre D1R y D5R (Nichols, 2010) y es por ello que en este trabajo de tesis nos referimos a los receptores tipo-D1R cuando utilizamos ligandos de D1R y D5R en sistemas nativos.

Distintas alteraciones en los niveles de expresión o en la sensibilidad a dopamina de los receptores tipo-D1R contribuyen a la fisiopatología y a los déficits cognitivos característicos de la esquizofrenia, la enfermedad de Parkinson y el envejecimiento (Abi-Dargham et al., 2022; Bäckman et al., 2011; Beyer et al., 2021; De Keyser et al., 1990; Fazio et al., 2018; Keeler et al., 2016; Kintz et al., 2017; McNab et al., 2009; Okubo et al., 1997; Wang et al., 1998). Además, se observó que el nivel de expresión de D1R se ve modificado luego de estimulaciones cognitivas tales como protocolos de entrenamiento de la memoria de trabajo y ejercicio físico (Herold et al., 2012; Kintz et al., 2017; McNab et al., 2009; Robison et al., 2018; Wass et al., 2013; Wass et al., 2018). Por lo tanto, la expresión de D1R parece ser dinámica y estar asociada a procesos neuronales plásticos. En particular, la CPF es una de las áreas donde el nivel de expresión de D1R es más variable tanto en situaciones patológicas como en respuesta a estimulaciones cognitivas (Kintz et al., 2017; Kolata et al., 2010; Okubo et al., 1997; Wass et al., 2018), aunque estos cambios en sus niveles de expresión no siguen un patrón claro. En la CPF el grado de activación de los tipo-D1R se asocia fuertemente a las capacidades cognitivas en “forma de U invertida”: siendo que niveles bajos o altos de activación de los tipo-D1R se asocian a un mal desempeño cognitivo, mientras que un grado de activación intermedio está ligado al desempeño cognitivo óptimo (Zahrt et

al., 1997). La acción global de D1R dependerá de los cambios en sus niveles de expresión, en su sensibilidad a dopamina y a las variaciones en la concentración de dopamina circulante. En este contexto, consideramos que estudiar la actividad constitutiva de D1R en la CPF podría contribuir a entender la relación entre los cambios de expresión y los déficits cognitivos en condiciones patológicas.

Los fármacos antipsicóticos: ligandos de receptores de dopamina

Los antipsicóticos son un conjunto de compuestos químicos de naturaleza diversa y de uso farmacéutico que tienen como blanco principal a los receptores de dopamina. Estos fármacos se utilizan en el tratamiento de la esquizofrenia y otros trastornos como el esquizoafectivo y el bipolar afectivo, para reducir los síntomas positivos, prevenir los brotes psicóticos y estabilizar la conducta (Lally & MacCabe, 2015). Sus efectos clínicos se atribuyen clásicamente a su acción como antagonistas de los receptores D2R. En contraste, los receptores tipo-D1R han sido menos estudiados como blanco terapéutico de los antipsicóticos, a pesar de que muchas evidencias bioquímicas demuestran que actúan como agonistas inversos de D1R y D5R (Cai et al., 1999; D'Aoust & Tiberi, 2010; Martin et al., 2001; McCarthy et al., 2020; Zhang et al., 2014). Algunos trabajos indican que ciertos antipsicóticos funcionarían parcialmente como antagonistas (Siafis et al., 2018) o agonistas de D1R (Oerther & Ahlenius, 2000). La contundencia de estos datos bioquímicos abre la puerta para investigar si los antipsicóticos modulan la actividad constitutiva de D1R en un contexto fisiológico.

Un aspecto importante a tener en cuenta en la farmacología clínica de los antipsicóticos, es que pueden causar varios efectos adversos como la disminución en el desempeño de la memoria de trabajo, distonías agudas, acatisia, parkinsonismo y discinesias (Blin, 1999; Blokland et al., 1998; Hou et al., 2006; Lally & MacCabe, 2015; Serretti et al., 2004). Otro inconveniente con los antipsicóticos es la falta de efecto sobre los denominados síntomas negativos, la baja efectividad y la sedación (Blin, 1999). En este sentido, es importante tener en cuenta que son drogas muy promiscuas y funcionan como ligandos o bloqueantes de muchos blancos celulares. Además de ser ligandos de los receptores de dopamina, tienen efectos sobre los receptores de serotonina 5-HT_{2A}, agonismo parcial sobre los receptores de serotonina 5-HT_{1A}, antagonismo y agonismo sobre los receptores muscarínicos, potenciación de la función de los receptores NMDA, modulación de la liberación de glutamato y aumento de la liberación de dopamina en la CPF (Miyamoto et al., 2005). Por ejemplo, la aplicación aguda *in vivo* de clorpromazina

y haloperidol, dos antipsicóticos de primera generación, previene la inducción de LTP en el giro dentado (Abe et al., 2008). En la CPF, la aplicación aguda de haloperidol reduce las EPSC, mientras que la aplicación de clozapina no tiene efecto (Gemperle et al., 2003). Por otro lado, la administración aguda de clozapina aumenta los LTP en la CPF, pero los disminuye en forma crónica (Gemperle & Olpe, 2004; Rame et al., 2017). Estas evidencias demuestran que los antipsicóticos pueden tener distintos efectos en forma aguda o crónica sobre los mismos circuitos neuronales. Debido a que son drogas indispensables para el tratamiento crónico de enfermedades psíquicas graves y que muchos de estos tratamientos son proclives a ser abandonados o a fracasar debido a sus efectos adversos, es indispensable aumentar los esfuerzos para dilucidar sus blancos moleculares y sus mecanismos de acción.

3. Los canales de calcio operados por voltaje (Ca_v)

Estructura y función de los Ca_v

Los Ca_v son una de las mayores fuentes de entrada de calcio actividad-dependiente presentes en células eléctricamente excitables como las neuronas. Son proteínas que responden a despolarizaciones de membrana abriéndose y permitiendo la entrada rápida y controlada de iones calcio a favor de su gradiente electroquímico (Dolphin, 2006). Así, se genera un aumento localizado en la concentración intracelular de calcio que impulsa un amplio abanico de procesos neuronales, como transcripción génica, liberación de neurotransmisores, crecimiento de neuritas y activación de enzimas dependientes de calcio (Catterall, 2011; Simms & Zamponi, 2014). De esta manera, los Ca_v son un grupo importante de transductores de señales presentes en las neuronas y, por lo tanto, se encuentran rigurosamente regulados.

Estructuralmente, los Ca_v son complejos proteicos de gran tamaño, formados por una subunidad principal formadora del poro $Ca_v\alpha_1$, en muchos casos acompañada de subunidades auxiliares o reguladoras $Ca_v\beta$ y $Ca_v\alpha_2\delta$ (Catterall, 2000). Como se observa en la figura 3, la subunidad $Ca_v\alpha_1$ se organiza en 4 dominios homólogos, con 6 segmentos transmembrana cada uno (S1-6), contiene el poro de conductividad iónica, formado por los S5 y S6 y sus bucles conectores, e incluye al sensor de voltaje formado por los S4 con residuos cargados positivamente (Catterall, 2000). En mamíferos, se identificaron 10 genes CACNA1x que codifican para la subunidad principal de los Ca_v (Catterall, 2000). El tipo de $Ca_v\alpha_1$ expresada en un canal determina sus propiedades

biofísicas y farmacológicas principales y funciona como criterio para clasificar a los distintos subtipos de Ca_v .

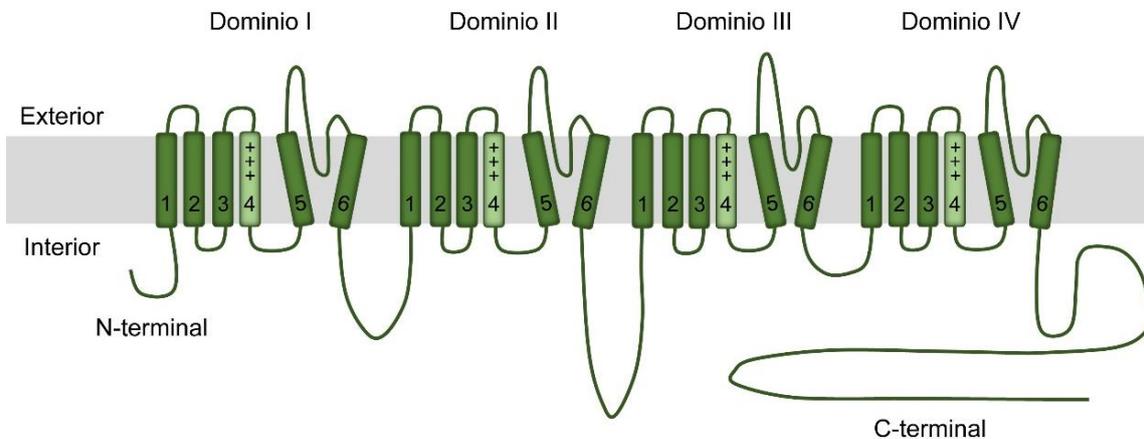


Figura 3. Representación esquemática de la estructura de la subunidad formadora del poro $Ca_v\alpha_1$, compuesta por cuatro dominios transmembrana (I-IV) cada uno conteniendo seis segmentos transmembrana (1-6). El segmento 4 de cada dominio contiene el sensor de voltaje cargado positivamente. Adaptado de (Dolphin & Lee, 2020).

Actualmente se reconocen tres subfamilias de Ca_v (Ca_v1 , Ca_v2 y Ca_v3). Es costumbre agrupar a estos subtipos en dos grandes categorías: los Ca_v activados a altos voltajes (Ca_v HVA, del inglés *high voltaje-activated*), que se abren en respuesta a grandes despolarizaciones de membrana (potenciales superiores a -10 mV) e incluyen a los Ca_v1 y Ca_v2 ; y los Ca_v activados a bajos voltajes (Ca_v LVA, del inglés *low voltaje-activated*), representados por los Ca_v3 , que se activan por cambios más pequeños en el voltaje. La subfamilia de los Ca_v1 incluye a los $Ca_v1.1$, presentes exclusivamente en células del músculo esquelético, a los $Ca_v1.2$ y $Ca_v1.3$, ampliamente distribuidos en el sistema nervioso, y a los $Ca_v1.4$, presentes principalmente en retina (Doering et al., 2007; Sinnegger-Brauns et al., 2009). Estos canales median corrientes de tipo L (del inglés *Long Lasting*) que son sensibles a las dihidropiridinas y se activan a altos voltajes, aunque el subtipo $Ca_v1.3$ se activa a voltajes relativamente más negativos en comparación con los otros integrantes de esta subfamilia. Las corrientes tipo L se caracterizan por tener una conductancia de canal único elevada, una inactivación por voltaje lenta, una marcada inactivación por calcio y una fuerte regulación por fosforilaciones (Catterall, 2011). Por otro lado, la subfamilia de los Ca_v2 está integrada por tres subtipos: los $Ca_v2.1$, que median corrientes de tipo P/Q (del inglés *Purkinje*), los $Ca_v2.2$, que median corrientes de tipo N (del inglés *Non-L* y *Neuronal*) y los $Ca_v2.3$,

que median corrientes tipo R (del inglés *Resistant*). Estos tres subtipos se activan a voltajes elevados y presentan una menor inactivación dependiente de calcio en comparación con los Ca_v1 . Finalmente, la subfamilia Ca_v3 incluye a canales que son activados a potenciales de membrana más hiperpolarizados: los $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$. Estos median corrientes de tipo T (del inglés *Transient*) que poseen una rápida cinética de activación y de inactivación.

La distribución asimétrica de los subtipos Ca_v en los compartimientos dendríticos, somáticos y presinápticos de las neuronas contribuye a la funcionalidad diferencial de estos canales. Por ejemplo, la activación de los canales presentes en terminales presinápticas desencadena la fusión de las vesículas sinápticas a la membrana y la liberación de neurotransmisores. Esta función presináptica se atribuye convencionalmente a los Ca_v2 (Kisilevsky & Zamponi, 2008b; Mochida, 2018), aunque muchas evidencias demostraron que los Ca_v1 y Ca_v3 median la liberación de neurotransmisores en algunas sinapsis del sistema nervioso (Fekete et al., 2014; Fell et al., 2016; Gregory et al., 2013; Huang et al., 2011; Jacus et al., 2012; Maddox et al., 2020; Tang et al., 2011). Por otro lado, la apertura de los Ca_v somatodendríticos puede generar despolarizaciones de membrana, llamadas potenciales de calcio, que contribuyen a la propagación de la señal y promueven procesos transcripcionales y de plasticidad dependientes de calcio (Higley & Sabatini, 2012). Si bien estas funciones postsinápticas fueron típicamente asociadas a los Ca_v1 (Dolmetsch et al., 2001; Perrier et al., 2002; Striessnig et al., 2014), se encontró que los $Ca_v2.2$ se encuentran muchas veces involucrados (Hamilton et al., 2010; Heinke et al., 2004; Mills et al., 1994). Por otra parte, se demostró que la actividad de los Ca_v3 expresados en somas y en el segmento inicial del axón afecta la excitabilidad neuronal y da forma al patrón de disparo (Bender et al., 2012; Chemin et al., 2002; Nigam et al., 2019; Weiss & Zamponi, 2019), si bien en algunos casos esta propiedad también puede estar influenciada por los Ca_v1 y Ca_v2 (Diaz & Dickenson, 1997; Moore & Murphy, 2020). Así, estas evidencias desafían la noción clásica de que existen canales exclusivamente presinápticos y otros postsinápticos y, en cambio, sugieren que la distribución de los Ca_v en la neurona es un proceso complejo, dinámico y que depende en gran medida de la combinación específica de proteínas reguladoras expresadas.

La cantidad de calcio que ingresa a un compartimiento neuronal por los Ca_v depende tanto de las propiedades biofísicas de los canales como del número de canales insertos en la membrana plasmática (Simms & Zamponi, 2012). Estos aspectos de su funcionalidad están estrictamente regulados por mecanismos que pueden actuar a nivel del ARNm, sobre el tráfico de los canales hacia y desde la membrana plasmática y/o

sobre las propiedades funcionales de los canales ya insertos en la membrana celular (Weiss & Zamponi, 2017). Los mecanismos que regulan a los Ca_v incluyen, por ejemplo, el *splicing* alternativo, la modulación de las propiedades intrínsecas de los Ca_v por el voltaje o por el propio calcio, la coexpresión de las subunidades auxiliares, la acción de ubiquitin ligasas, la regulación por cascadas activadas por GPCRs y la interacción directa con otras proteínas de membrana (Currie, 2010; Dolphin, 2016; Huang & Zamponi, 2017; Simms & Zamponi, 2012). Asimismo, la densidad de canales en la membrana depende del balance entre su tráfico desde el retículo endoplasmático hacia la membrana y del grado de internalización de los mismos. En particular, la unión de las subunidades auxiliares $\text{Ca}_v\beta$ y $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$ a la subunidad principal promueve su tráfico desde el retículo endoplasmático hacia la membrana y su estabilidad en la misma, además de modificar sus propiedades cinéticas y su regulación por segundos mensajeros (Dolphin, 2012). Los Ca_v1 y Ca_v2 requieren de la coexpresión de estas subunidades auxiliares para traficar correctamente a membrana. En cambio, en el caso de los Ca_v3 la subunidad principal es capaz de formar un canal funcional en ausencia de las subunidades auxiliares y la unión de las mismas aumenta aún más su tráfico a membrana y su amplitud de corriente (Simms & Zamponi, 2012).

Perturbaciones en la actividad de los Ca_v y en los procesos que la regulan se asociaron a desórdenes neurológicos como epilepsia, migraña, depresión y dolor crónico (Cain & Snutch, 2011; Dubovsky, 2019; Kabir et al., 2017; van den Maagdenberg et al., 2004; Weiss & Zamponi, 2019). Muchas de estas anomalías, a las que se le dio el nombre de “canalopatías”, son consecuencia de mutaciones de Ca_v que generan cambios en las propiedades cinéticas o biofísicas de los canales (Kass, 2005; Pietrobon, 2002). En los últimos años se han publicado artículos de opinión que amplían el concepto de canalopatías asociadas a desórdenes psiquiátricos a desbalances en el nivel de expresión, las modificaciones postraduccionales, el tráfico o la acción de proteínas reguladoras de los Ca_v (Curran & Mohler, 2015; Terragni et al., 2018). Estos defectos son más difíciles de estudiar en comparación aquellos producidos por mutaciones puntuales, debido a las múltiples interacciones y modificaciones que sufren los Ca_v durante su maduración. Aunque existen fármacos actualmente usados en la clínica que afectan a los canales maduros, se ha planteado la necesidad de diseñar o identificar drogas preexistentes que actúen sobre el tráfico de canales inmaduros y/o sus proteínas reguladoras (Terragni et al., 2018).

Localización y función de Cav2.2 en el sistema nervioso

Las corrientes mediadas por Cav2.2 fueron inicialmente distinguidas por su alta sensibilidad a ω -conotoxina GVIA, un péptido neurotóxico producido por los caracoles marinos del género *Conus*, y por su dependencia del voltaje intermedia, siendo más negativa y rápida que los Cav1, pero más positiva y lenta en comparación con los Cav3 (Nowycky et al., 1985; Williams et al., 1992). Estos canales se expresan exclusivamente en el sistema nervioso y están ampliamente distribuidos en áreas centrales y periféricas como el cerebelo, el cuerpo estriado, el tálamo, el hipotálamo, la corteza y la médula espinal (Coppola et al., 1994; Dubel et al., 1992; Fujita et al., 1993; Takemura et al., 1989; Tanaka et al., 1995; Westenbroek et al., 1998; Xu et al., 2010). En muchos casos, los Cav2.2 controlan la liberación de neurotransmisores (Mochida, 2018), aunque también se observó que pueden regular procesos de expresión génica y excitabilidad. En el sistema nervioso periférico, los Cav2.2 tienen un rol central en las vías del dolor y se identificaron como proteínas blanco en el tratamiento del dolor neuropático crónico (Schroeder et al., 2006). Por ejemplo, desbalances en las isoformas de *splicing* alternativo del Cav2.2 contribuyen a la acción reducida de morfina en dolor crónico (Raingo et al., 2007). Por otra parte, en el sistema nervioso central se reportó que su actividad es relevante en varias funciones fisiológicas, como la respuesta ante estímulos aversivos (Bunda et al., 2019), comportamientos agresivos (Kim et al., 2009) y comportamientos asociados al miedo y la ansiedad (Blazon et al., 2021), y en estados patológicos como enfermedad de Parkinson (Saegusa et al., 2020), enfermedad de Huntington (Silva et al., 2017) y adicción (Buchta et al., 2020). La importancia de estas funciones centrales y periféricas se evidencia en el fenotipo de los ratones transgénicos que carecen de Cav2.2. Estos animales son menos sensibles al dolor inflamatorio y neuropático (Saegusa et al., 2002) y muestran cambios en los estados de vigilia, hiperagresividad e hiperactividad (Beuckmann et al., 2003; Kim et al., 2009).

La funcionalidad de los Cav2.2 en algunas regiones del cerebro parece estar bien diferenciada de la actividad de Cav2.1. Se propuso que en muchas sinapsis excitatorias en regiones del sistema nervioso central, como el hipocampo, el cerebelo y la corteza, la liberación de glutamato estaría acoplada en mayor medida a los Cav2.1 (Lübbert et al., 2019; Millán & Sánchez-Prieto, 2002; Qian & Noebels, 2001; Stephens et al., 2001), mientras que la actividad de los Cav2.2 en la presinapsis se encontraría más asociada a la liberación de GABA (Basarsky et al., 1994; Blazon et al., 2021; Martinez Damonte et al., 2018). Particularmente para la CPF, se reportó que la liberación de GABA desde algunas interneuronas depende únicamente de los Cav2.1 y no de los Cav2.2 (Zaitsev et al., 2007). En cambio, se demostró que los Cav2.2, típicamente localizados en

terminales presinápticas, tienen una distribución anómala dada por una alta densidad de canales en dendritas y soma en algunas regiones del sistema nervioso como la CPF (Westenbroek et al., 1992), el hipocampo (Mills et al., 1994) y la médula espinal (Heinke et al., 2004; Jablonka et al., 2007). En este contexto, la actividad de $Ca_v2.2$ cumpliría un rol diferente al de controlar la liberación de neurotransmisores y podría estar involucrada en funciones como el control de la transcripción y la respuesta postsináptica.

Los $Ca_v2.2$ se encuentran rigurosamente regulados y son altamente sensibles a la modulación por GPCRs (Agosti et al., 2014; Cordisco Gonzalez et al., 2020; Lopez Soto et al., 2015; Martinez Damonte et al., 2018; Mustafa et al., 2017; Raingo et al., 2007; Zamponi & Currie, 2013). Muchas evidencias demostraron que estos canales son regulables mediante interacciones físicas con otras proteínas. Por ejemplo, se observó que la prostaglandina D2 sintasa, el transportador de solutos 38 (SLC38, del inglés *solute carrier 38*) y la proteína transmembrana 223 interaccionan físicamente con $Ca_v2.2$ y regulan negativamente su expresión (Mallmann et al., 2019). Como mencionamos previamente, la interacción física con algunos GPCRs como el D1R, el D2R y el receptor del péptido de nociceptina (ORL-1, del inglés *opioid receptor like-1*) modula positivamente a los $Ca_v2.2$ (Beedle et al., 2004; Kisilevsky et al., 2008; Kisilevsky & Zamponi, 2008a). En particular, D1R y $Ca_v2.2$ colocalizan en la postsinapsis de neuronas piramidales en la capa 5/6 de la CPFm de ratón (Kisilevsky et al., 2008). Se reportó que la interacción física entre D1R y $Ca_v2.2$ aumenta la densidad de canales en membrana plasmática. Es posible que este mecanismo tenga un impacto funcional en las corrientes $Ca_v2.2$ en neuronas de la CPFm y que involucre la actividad constitutiva de D1R. Por otro lado, la activación por dopamina de D1R inhibe en forma aguda las corrientes $Ca_v2.2$ (Surmeier et al., 1995), aumentando la complejidad de la acción de este receptor.

Teniendo en cuenta la importancia de los Ca_v y de los receptores D1R en el sistema nervioso, creemos que estudiar la regulación no canónica de los Ca_v por la actividad constitutiva de D1R significaría un aporte relevante y útil para comprender la manera en que la actividad de las neuronas de la CPFm contribuye a su funcionamiento fisiológico y al desarrollo de patologías severas.

Objetivos

Objetivo general

En base a los antecedentes desarrollados decidimos ***investigar el impacto de la actividad constitutiva de D1R sobre las corrientes Ca_v , su modulación por el fármaco antipsicótico clorpromazina y su rol en neuronas piramidales de la CPFm.***

Objetivos específicos

A continuación, detallamos nuestras hipótesis de trabajo, los objetivos específicos planteados para contrastarlas y el diseño experimental planteado para abordarlos.

Hipótesis 1: la actividad constitutiva de receptores tipo-D1R modula las corrientes Ca_v en neuronas piramidales de la CPFm.

Objetivo 1. Explorar el efecto de clorpromazina sobre las corrientes nativas Ca_v en neuronas piramidales de la CPFm.

Para abordar el objetivo 1, planteamos el siguiente diseño experimental:

- Comparar las corrientes nativas Ca_v en neuronas piramidales de la CPFm provenientes de animales tratados mediante inyecciones intraperitoneales (IP) con clorpromazina o vehículo.
- Aislar el efecto de clorpromazina IP dependiente de los receptores tipo-D1R utilizando un antagonista específico aplicado intra-CPFm.

Hipótesis 2: Los canales $Ca_v2.2$ contribuyen significativamente a las corrientes nativas Ca_v en la CPFm y a la sensibilidad de estas corrientes a la actividad constitutiva de los receptores tipo-D1R

Objetivo 2. Establecer la contribución de los diferentes subtipos de Ca_v a las corrientes de calcio nativas en la CPFm y su sensibilidad diferencial a la actividad constitutiva de receptores tipo-D1R.

Para abordar el objetivo 2, planteamos el siguiente diseño experimental:

- Estudiar el efecto de bloqueantes específicos de los distintos subtipos Ca_v en neuronas piramidales de la CPFm provenientes de animales tratados con clorpromazina o vehículo.
- Investigar en un sistema de expresión heteróloga la sensibilidad de los distintos subtipos Ca_v a la coexpresión de D1R.

Hipótesis 3: La actividad constitutiva de D1R es necesaria para el aumento de la densidad $Ca_v2.2$ en la membrana plasmática causado por la coexpresión de D1R, y genera un incremento en estas corrientes de calcio.

Objetivo 3. Investigar aspectos del mecanismo celular involucrado en el aumento de las corrientes $Ca_v2.2$ por la coexpresión de D1R, utilizando un sistema de expresión heteróloga.

Para abordar el objetivo 3, planteamos el siguiente diseño experimental:

- Estudiar si el nivel de expresión de D1R modifica su efecto sobre las corrientes $Ca_v2.2$ en células HEK293T transfectadas.
- Comparar el efecto de D1R salvaje con mutantes de D1R que carecen de actividad constitutiva sobre las corrientes $Ca_v2.2$.
- Estudiar si este efecto depende de una interacción física entre D1R y $Ca_v2.2$.
- Estudiar la vía de señalización intracelular involucrada.
- Estudiar si el efecto de D1R modifica la densidad de canales $Ca_v2.2$ funcionales presentes en la membrana plasmática.

Hipótesis 4: La mayor disponibilidad de canales $Ca_v2.2$ somatodendríticos producida por la actividad constitutiva de tipo-D1R impacta en los efectos de dopamina sobre la funcionalidad de neuronas piramidales de la CPFm.

Objetivo 4. Estudiar el impacto de la actividad constitutiva de los receptores tipo-D1R sobre el efecto funcional de su actividad evocada por agonista en las neuronas piramidales de la CPFm.

Para abordar el objetivo 4, planteamos el siguiente diseño experimental:

- Comparar el efecto de la actividad evocada por agonista de los receptores tipo-D1R sobre las corrientes Ca_v nativas en neuronas de la CPFm provenientes de animales tratados con clorpromazina o vehículo.
- Evaluar el efecto de dopamina sobre las corrientes $Ca_v2.2$ recombinantes en condiciones experimentales con distintos niveles de actividad constitutiva de D1R.
- Comparar las corrientes postsinápticas evocadas y miniatura en neuronas de la CPFm provenientes de animales tratados con clorpromazina o vehículo, y su sensibilidad a un agonista específico de los receptores tipo-D1R.
- Evaluar si clorpromazina es capaz de prevenir el aumento en la actividad transcripcional inducido por un agonista de los receptores tipo-D1R en la CPFm.

Materiales y Métodos

1. Modelos experimentales

1.1. Líneas celulares

Células HEK293T. Esta línea celular deriva de la línea HEK 293 (del inglés *Human Embryonic Kidney 293*) y posee, adicionalmente, un alelo sensible a la temperatura del gen del antígeno T grande del virus SV40 (del inglés *Simian Virus 40*). Estas células representan una línea celular altamente transfectable y comúnmente utilizada para la expresión de proteínas heterólogas (Thomas & Smart, 2005).

Células HEK Epac-S H187. Esta línea celular deriva de la línea HEK 293 y presenta expresión estable del plásmido pcDNA3.1/Zeo(1)-mTurquoise2-EPAC-cp173Venus-Venus (Epac-S H187, del inglés *Exchange protein directly activated by cAMP S H187*). Fue generada y mantenida en el Instituto de Investigaciones Farmacológicas (ININFA, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA), como se detalla más adelante.

1.2. Animales

En este estudio utilizamos ratones (*Mus musculus*) de la cepa C57BL/6 salvajes de entre 4 y 9 semanas de edad de ambos sexos según se indica para experimento (n=85). C57BL/6 es una cepa endogámica y constituye uno de los genotipos de ratones más utilizados en investigación. Los animales fueron generados y mantenidos en el bioterio del Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE) bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 h (luz de 7:00 a 19:00 h; oscuridad de 19:00 a 7:00 h), temperatura constante y controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) y con acceso *ad libitum* a agua levemente acidificada y alimento balanceado (Gepsa, Grupo Pilar, Argentina). Los animales se alojaron en jaulas colectivas con lecho de viruta, con una densidad máxima de 5 animales por jaula, separándolos en jaulas individuales aproximadamente una semana antes de ser utilizados.

Todos los experimentos con animales presentes en esta tesis doctoral recibieron la aprobación del comité de ética del IMBICE (Expediente CICUAL #120319) y se llevaron a cabo en estricta concordancia con las recomendaciones de la Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud (EEUU), intentando minimizar el sufrimiento animal en cuanto fuera posible.

2. Drogas

La tabla 1 detalla las diferentes drogas que utilizamos en este trabajo de tesis.

Tabla 1. Listado de drogas empleadas en este trabajo de tesis.

Nombre	Acción	Identificación	Marca	Origen
Clorpromazina clorhidrato	Fármaco antipsicótico	50-53-3	Laboratorios Duncan SA	Argentina
Haloperidol	Fármaco antipsicótico	52-86-8	Denver Farma	Argentina
Hidrocloruro de (-)-Quinpirole	Agonista de receptores D2R	85798-08-9	Sigma-Aldrich	EEUU
Hidrocloruro de (±)-SKF-38393	Agonista de receptores tipo-D1R	62717-42-4	Sigma-Aldrich	EEUU
Hidrocloruro de Dopamina	Agonista de receptores de dopamina	62-31-7	Sigma-Aldrich	EEUU
Hidrocloruro de R(+)-SCH-23390	Antagonista de receptores tipo-D1R	125941-87-9	Sigma-Aldrich	EEUU
Nifedipina	Bloqueante de canales Cav1	N-7634	Sigma-Aldrich	EEUU
Niquel Cloruro 6-Hidrato	Bloqueante de canales Cav3	2000979900	Biopack, SA	Argentina
N-etil bromuro de lidocaína; QX-314	Bloqueante de canales Nav	552233	Calbiochem	EEUU
Risperidona	Fármaco antipsicótico	1 mg. L066	Savant Pharm SA	Argentina
Tetrodotoxina	Bloqueante de canales Nav.	4368-28-9	Sigma-Aldrich	EEUU
Toxina Colérica	Inhibidor selectivo de la proteína Gs	9012-63-9	Sigma-Aldrich	EEUU

ω-agatoxina IVA	Bloqueante de canales Cav2.1	145017-83	Alomone Labs	Israel
ω-conotoxina-GVIA	Bloqueante de canales Cav2.2	106375-28-4	Alomone Labs	Israel

3. Procedimientos y tratamientos en animales

3.1. Cirugías estereotáxicas para la implantación de cánulas intra-CPFm

Realizamos cirugías estereotáxicas en animales para implantar cánulas intra-CPFm que permitieron la inyección directa de las drogas en este tejido. Para ello, contamos con la colaboración de la Dra. Cornejo del Laboratorio de Neurofisiología del IMBICE que cuenta con una amplia experiencia en estas técnicas experimentales. Todas las cirugías fueron realizadas en el cuarto de cirugías del bioterio del IMBICE con material adecuado y en condiciones de asepsia. Utilizamos ratones machos salvajes de 8 semanas de edad anestesiados con una mezcla de Ketamina (150 mg/kg de peso IP) y Xilacina (15 mg/kg de peso IP). Una vez alcanzada la anestesia completa del animal, lo posicionamos en el aparato estereotáxico, realizamos un corte en la piel de la calota y eliminamos las membranas que recubren el cráneo para poder visualizar el punto de bregma y establecer las coordenadas estereotáxicas del mismo. Utilizamos las siguientes coordenadas para poder colocar una cánula guía permanente (4 mm de largo, calibre 22G, *Plastics One Inc.*, EEUU) dentro del parénquima de la CPF: +1.9 mm antero-posterior; +0.5 mm medio-lateral y -2,0 mm dorso-ventral, relativas al bregma, siguiendo las coordenadas del Atlas del cerebro de ratón de Paxinos y Franklin (Paxinos & Franklin, 2019). En ese preciso lugar perforamos el cráneo, colocamos la cánula guía y la fijamos al hueso con cementante dental. Finalmente, cerramos la herida y tapamos el extremo libre de la cánula con un obturador adecuado. Después de la cirugía, alojamos a los ratones en jaulas individuales y los dejamos recuperar durante 5 días, tratándolos diariamente con flunixin meglumina (Flumeg 5 %) para reducir la inflamación. Para minimizar el estrés, manipulamos diariamente a los ratones hasta el día experimental.

3.2. Inyecciones intra-CPF

Cinco días después de la implementación de las cánulas guía, realizamos inyecciones unilaterales (0,5 μ l; tasa de infusión 0,1 μ l/20 s) de clorpromazina (1 μ g/animal), SCH23390 (1 μ g/animal) o vehículo (líquido cefalorraquídeo artificial, aCSF, del inglés *artificial cerebrospinal fluid*, cuya composición se detalla más adelante), según

se indica para cada *set* experimental. Adicionamos fluoroesferas (*FluoSpheres*TM 0,25%, *Red Fluorescent, Invitrogen, #F8793*, EEUU) a las soluciones para visualizar la correcta infusión de las mismas al parénquima de la CPFm. Mantuvimos la aguja *in situ* durante 1 min para luego removerla cuidadosamente.

3.3. Inyecciones intraperitoneales (IP)

Realizamos inyecciones IP en ratones salvajes de 4 a 9 semanas de edad (de ambos sexos contrabalanceados) (0,1 ml/10 g de peso) utilizando vehículo (solución salina NaCl 0,9 %), clorpromazina (1 mg/kg de peso) o SKF38393 (3 mg/kg de peso) según se indica para cada *set* experimental.

4. Obtención de rebanadas de cerebro para registros electrofisiológicos

Anestesiados ratones con isoflurano (2 %) y los decapitamos inmediatamente. Procedimos con la disección y extracción de los cerebros y los sumergimos inmediatamente en una solución de corte enfriada con hielo y burbujeada con gas carbógeno 95 % O₂ y 5 % CO₂, de composición (en mM): 110 cloruro de colina, 25 glucosa, 25 NaHCO₃, 7 MgCl₂, 11,6 ácido ascórbico, 3,1 piruvato de sodio, 2,5 KCl, 1,25 NaH₂PO₄ y 0,5 CaCl₂, pH 7,4 (equilibrado con NaOH). Obtuvimos rebanadas coronales de cerebro de ratón que contienen la CPFm (~ 300 µm, 1,5-2,5 mm anterior a bregma) utilizando un vibrátomo *PELCO easiSlicer*TM (# 11000, *Ted Pella Inc.*, EEUU) y las transferimos a una cámara de incubación con aCSF burbujeado con gas carbógeno 95 % O₂ y 5 % CO₂ conteniendo (en mM): 124 NaCl, 26,2 NaHCO₃, 11 glucosa, 2,5 KCl, 2,5 CaCl₂, 1,3 MgCl₂ y 1 NaHPO₄, pH 7,4 (equilibrado con HCl). Mantuvimos las rebanadas a 37°C durante 15 min y luego a temperatura ambiente (~ 24°C) durante 30 min para su recuperación antes de comenzar los registros electrofisiológicos.

5. Obtención de rebanadas de cerebro para inmunohistoquímica

Realizamos perfusiones transcardiales en ratones machos salvajes de 8 semanas de edad con formaldehído al 4 % como fijador siguiendo el procedimiento que se explica a continuación. Anestesiados a los ratones con una mezcla de Ketamina (150 mg/kg de peso IP) y Xilacina (15 mg/kg de peso IP) y, una vez alcanzado el nivel de anestesia adecuado, los sujetamos en una mesa de cirugía por las extremidades con el abdomen hacia arriba. Luego, realizamos una incisión en la piel del abdomen de los ratones avanzando sobre la línea media torácica hasta las clavículas. Realizamos dos incisiones laterales adicionales, por debajo de las costillas, para exponer el campo torácico completo. Sostuvimos con fórceps el cartílago del proceso xifoideo para acceder al corazón. Conectamos el sistema de perfusión directamente al ventrículo

izquierdo del corazón con una aguja 22G. Acto seguido, realizamos un corte en la aurícula derecha para permitir el escape de la circulación de retorno de los líquidos de lavado. Inicialmente, perfundimos a los ratones con una solución de lavado (PBS 0,01 M pH 7,4 conteniendo 10 µl/ml de heparina) a un flujo de 5 ml/min durante 2 min. Luego, perfundimos con formaldehído al 4 % durante 10 min a un flujo de 5 ml/min. Al finalizar la perfusión, aislamos los cerebros y los fijamos en solución de formaldehído al 4 % durante 2 h. Finalmente, crio-preservamos los tejidos mediante la incubación durante la noche en una solución de sacarosa al 20 %. Al día siguiente, congelamos los cerebros de los ratones en hielo seco y los cortamos en 4 series equivalentes de secciones coronales de 40 µm de espesor utilizando un crióstato (Leica CM1520, Alemania).

6. Inmunohistoquímicas y tinciones

Realizamos inmunohistoquímicas cromogénicas simples sobre secciones coronales de cerebro en flotación. En primer lugar, lavamos las secciones coronales de cerebro con buffer fosfato salino (PBS, en mM: 137 NaCl, 2,7 KCl, 10 Na₂HPO₄ y 2 KH₂PO₄, pH 7,4) 3 veces durante 10 min cada vez en agitación. Posteriormente, las incubamos con 10 ml de H₂O₂ 0,5 % en PBS durante 30 min para bloquear la peroxidasa endógena del tejido. Luego de otros 3 lavados, bloqueamos la unión inespecífica del anticuerpo primario incubando las secciones de cerebro con 3 % de suero normal de burro y 0,25 % TritonX en PBS durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación. Luego, incubamos las secciones con el anticuerpo primario anti-c-Fos (*Oncogene*, #PC38-100UL; 1:20000) a 4°C durante 48 h. Posteriormente, realizamos 3 lavados e incubamos las muestras durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo biotinilado (*Jackson ImmunoResearch Laboratories*, #711-065-152; 1:3000). Luego de 1 h lavamos las secciones y las incubamos nuevamente durante 1 h con el complejo avidina-peroxidasa biotinilada (*Vectastain Elite Kit*, #PK-6100). Finalmente revelamos la reacción con el sustrato 2',2'-diaminobencidina comercial en presencia de NiCl₂ durante 8 min, lo cual produjo un precipitado negro-violeta en los núcleos inmunoreactivos para c-Fos.

Una vez finalizadas las inmunotinciones, montamos los cortes de cerebro en orden antero-posterior en portaobjetos de vidrio positivados, los deshidratamos y cubrimos con medio de montaje (Bálsamo de Canadá) para observarlas al microscopio de luz blanca (Nikon Eclipse 50i) equipado con una cámara Nikon DS-Ri1. Para todas las inmunotinciones realizamos controles en los cuales se procesaron las secciones de cerebro con el protocolo descrito, pero sin el agregado del anticuerpo primario o secundario. Para realizar el análisis neuroanatómico cuantitativo utilizamos el atlas del

cerebro de ratón de Paxinos y Franklin (Paxinos & Franklin, 2019) para identificar las secciones coronales del cerebro y localizar los límites anatómicos de la CPFm. Para determinar el número total de células inmunoreactivas para c-Fos utilizamos el software Fiji (ImageJ, EEUU) y expresamos los resultados como células positivas para c-Fos (c-Fos+) por hemi-CPFm.

7. Mantenimiento de cultivos celulares

7.1. Células HEK293T

Mantuvimos las células HEK293T en botellas T25 (*NEST Biotechnology Co.*, # 707003, China) con medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, *Gibco™*, *Thermo-Fisher*, # 12800017, EEUU) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB, *Internegocios SA*, #1650-01, Argentina). Conservamos las botellas en una estufa de cultivo a 37°C en atmósfera con 5 % CO₂, 95 % de aire y humedad controlada. El repique y subcultivo se realizó cuando las células alcanzaron el 80 % de confluencia como se detalla a continuación. En primer lugar, retiramos el medio de cultivo, adicionamos 3 ml de solución cítrico salina (172 mM de KCl y 17 mM de citrato de sodio) e incubamos en estufa de cultivos durante 10 min para asegurar el desprendimiento de la monocapa celular. Luego disgregamos mecánicamente por pipeteo y conservamos 0,5 ml de la suspensión celular en un volumen final de 5 ml de DMEM suplementado con 10 % SFB. Para los experimentos de *patch clamp* realizamos subcultivos en pocillos de 22,1 mm de diámetro, adicionando 0,1 ml de la suspensión celular en un volumen de 1 ml de medio de cultivo. Para los experimentos de imágenes y mediciones AMPc basal realizamos subcultivos en pocillos de 35 mm de diámetro, en los cuales agregamos 70 µl de suspensión celular en 2 ml de DMEM suplementado con 10 % SFB.

7.2. Células HEK293T Epac-S H187

Para las medidas de AMPc estimulado por ligandos, utilizamos la línea celular HEK293T con expresión estable del plásmido Epac-S H187. El constructo Epac-S H187 fue facilitado por el Dr. Kees Jalink (Klarenbeek et al., 2011). Esta línea celular fue generada y mantenida en el Instituto de Investigaciones Farmacológicas (ININFA, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA) bajo la supervisión del Dr. Agustín Yanéff. Brevemente, se obtuvo dicha línea celular mediante la transfección de células HEK293T con *K2™ Transfection System* (*Biontexas*, # T060, Alemania). Se realizó la selección clonal en pocillos de 5 mm de diámetro, en presencia de 25 µg/ml de zeocina (*InvivoGen*, # 11006-33-0, EEUU) durante 2 semanas. Se evaluó la presencia del plásmido Epac-S H187 mediante mediciones del espectro de fluorescencia (450 - 650 nm) utilizando un lector multimodo de placas *FlexStation 3* (*Molecular Devices*, EEUU) y excitando a una

longitud de onda de 430 nm, para luego seleccionar el clon de HEK Epac-S H187 que presentara una mayor emisión de fluorescencia. Se mantuvo la línea celular clonada en medio de cultivo DMEM suplementado con 10 % de SFB, 50 µg/ml de gentamicina y 12.5 µg/ml de zeocina. Sembramos las células en pocillos de 5 mm de diámetro a una densidad de 10⁵ células/pocillo.

8. Biología molecular

8.1. Estrategias de clonación

D1R salvaje y D1RS199A ligados a la proteína fluorescente amarilla (YFP, del inglés *yellow fluorescent protein*): utilizamos mutagénesis dirigida como estrategia para generar el mutante único D1RS199A, que posee un intercambio de una serina por una alanina en la posición 199 (previamente caracterizado por (Al-Fulaij et al., 2008)). Luego, para generar las versiones de D1R salvaje y D1RS199A ligadas a la proteína fluorescente YFP, amplificamos por PCR las secuencias del receptor sin codón de *stop*, con un oligonucleótido *sense* con un sitio de corte EcoRI y un oligonucleótido *antisense* con un sitio de corte BamHI. Generamos la digestión del fragmento obtenido por PCR con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI, para luego insertarlo en los sitios EcoRI y BamHI del vector PRK6-YFP.

Péptidos D1R *loop* 1 y D1R *loop* 2: los plásmidos conteniendo el ADNc que codifica los péptidos D1R *loop* 1 (aminoácidos 52 a 57) y D1R *loop* 2 (aminoácidos 118 a 138) incluidos en el vector de expresión en bacterias pGEX-5.1 fueron donados por el Dr. Zamponi (Universidad de Calgary, Canadá). Para expresar los péptidos D1R *loop* 1 y D1R *loop* 2 en una línea celular de mamífero, clonamos las secuencias sintéticas mediante ligación con extremos romos en un vector pcDNA6 con IRES-eGFP.

Péptido Cav2.2 C-terminal: amplificamos la porción proximal del fragmento C-terminal perteneciente a la proteína Cav2.2 mediante una PCR con un *primer* de oligonucleótido *sense* con BamHI, un codón ATG 5207-5222 y los nucleótidos 5207-5222 del Cav_v2.2; y un *primer* de oligonucleótido *antisense* con un sitio P_{svl} seguido de un codón de *stop* y los nucleótidos 6037-6023 del Cav_v2.2. Sub-clonamos la secuencia que codifica para la parte proximal de la región C-terminal de Cav_v2.2 en un vector pcDNA6 con IRES-eGFP.

Todos los constructos finales fueron verificados por secuenciación de Sanger realizada por *Macrogen Inc.* (Corea del Sur).

8.2. Amplificación de clones para transfección

8.2.1. Cepa bacteriana

Para amplificar los plásmidos de interés, utilizamos la cepa bacteriana DH5 α de la bacteria *Escherichia coli* (Kostylev et al., 2015). Esta cepa bacteriana presenta una alta eficiencia de transformación con ADN no metilado (hsdR), resistencia a los fagos T1 (fhuA2), ausencia de actividad endonucleasa inespecífica I (endA1), lo que aumenta la estabilidad de los insertos, y es sensible a los antibióticos (ATB) ampicilina y kanamicina.

8.2.2. Obtención de bacterias competentes

Utilizamos el método Inoue para obtener bacterias competentes (Sambrook & Russell, 2006). En primer lugar, partimos de un *stock* de la cepa DH5 α de *E. coli* y sembramos una ansada sobre una placa de medio Luria Bertani (LB, en %: 1,5 agar-agar, 1 triptona, 0,5 extracto de levadura y 1 NaCl en agua *milliQ*) en esterilidad y sin ATB, que incubamos a 37°C durante la noche. Al día siguiente picamos una colonia, la transferimos a 5 ml de medio LB el cual incubamos durante 6 a 8 h a 37°C con agitación. Utilizamos este cultivo para inocular tres Erlenmeyers con 100 ml de medio LB sin ATB cada uno, que recibieron cantidades decrecientes de cultivo (4, 1,6 y 0,8 ml). Incubamos los Erlenmeyers durante la noche a 18°C. Luego, realizamos las lecturas de densidad óptica a 600 nm hasta obtener un valor de absorbancia de 0,55 en alguno de los tres cultivos. Transferimos el cultivo seleccionado a un baño de hielo durante 10 min, para luego centrifugar a 4000 rpm por 10 min a 4°C. Descartamos el sobrenadante, dejamos secar el *pellet* por 2 min y resuspendimos las células en 32 ml de buffer Inoue frío (en mM: 55 MnCl₂.4H₂O, 15 CaCl₂.2H₂O, 250 KCl, 10 PIPES, pH 6,7). Repetimos la centrifugación y el secado, y resuspendimos las células en 8 ml de buffer Inoue con 0,64 ml de dimetilsulfóxido. Fraccionamos dicha suspensión en alícuotas de 200 μ l y las conservamos a -80°C hasta su uso.

8.2.3. Transformación de bacterias competentes con ADN plasmídico

Utilizamos el protocolo descrito por (Cohen & Chang, 1974) para transformar las bacterias competentes. Brevemente, agregamos 50 ng de ADN plasmídico a 200 μ l de suspensión de bacterias competentes. Incubamos en hielo durante 30 min y luego realizamos un choque térmico de 45 s de duración transfiriendo la mezcla a un baño de agua a 42°C. A continuación, colocamos el tubo nuevamente en hielo durante 10 min, agregamos 800 μ l de medio SOC (2% triptona, 0,5% extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ y 20 mM glucosa) e incubamos en agitación a 37°C por 40 min. Finalmente, sembramos las bacterias en placas con agar LB con el ATB de selección adecuado e incubamos a 37°C durante la noche para permitir el crecimiento de las colonias transformadas.

8.2.4. Preparación de ADN plasmídico a mediana escala (Midiprep)

Tomamos 0,5 ml de un cultivo de bacterias transformadas con el plásmido de interés e inoculamos 200 ml de medio LB con el ATB de selección correspondiente. Incubamos a 37 °C durante 12-16 h en agitación. Luego centrifugamos el cultivo por 30 min a 4000 rpm y a 4 °C para separar las bacterias. Obtuvimos el ADN plasmídico utilizando un kit comercial (*QIAfilter™ Plasmid Midi Kit*, # 12145, EEUU) según las indicaciones del fabricante.

8.2.5. Cuantificación de ADN

Cuantificamos las muestras de ADNc utilizando el espectrofotómetro *NanoDrop 2000c* (*Thermo Fisher Scientific Inc.*, EEUU), midiendo la absorbancia a 260 nm y siguiendo las instrucciones del fabricante. Utilizamos las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230 como parámetros de calidad del ADN.

9. Expresión heteróloga

Para los experimentos de *patch clamp*, mediciones de AMPc basal y ensayos de imágenes, transfectamos transitoriamente células HEK293T crecidas en placas de cultivo al 70-80 % de confluencia utilizando el método de liposomas catiónicos con el reactivo *Lipofectamine 2000* (*Invitrogen*, #11668-019, EEUU). Siguiendo las indicaciones del proveedor, preparamos las mezclas de transfección con una relación *Lipofectamine/ADN* de 1:2, en el medio de transfección recomendado (*Opti-MEM™*, *Gibco*, #31985062). Agregamos las mezclas de transfección a las placas de cultivo e incubamos las células a 37°C durante 24 h (en células transfectadas con Ca_v2.1-2) o 48 h (en células transfectadas con Ca_v1.2-3 y Ca_v3.1-3) para permitir la correcta expresión de los clones utilizados. Para los ensayos de mediciones de AMPc intracelular estimulado por ligandos, realizamos transfecciones transitorias de células HEK293T Epac-S H187 al 80-90% de confluencia, utilizando el Sistema de Transfección *K2™* (*Biontex*, Munich, Alemania) de acuerdo con las indicaciones del proveedor. Los ensayos se realizaron 48 h post transfección. La tabla 2 detalla la lista de clones codificantes para diferentes proteínas utilizados en este trabajo de tesis.

Tabla 2. Clones codificantes empleados en este trabajo de tesis.

Nombre usado en esta tesis	Nombre completo oficial del gen	Símbolo oficial del gen	Número de acceso GenBank	Modificación	Procedencia
Cav1.2	<i>calcium channel, voltaje-dependent alpha 1C subunit</i>	Cacna1c	AY728090	-	Donado por Dr. D. Lipscombe (EEUU)
Cav1.3	<i>calcium voltaje-gated channel subunit alpha 1D</i>	Cacna1d	AF370009	-	Donado por Dr. D. Lipscombe (EEUU)
Cav2.1	<i>calcium channel, voltaje-dependent, alpha 1A subunit</i>	Cacna1a	AY714490	-	Donado por Dr. D. Lipscombe (EEUU)
Cav2.2	<i>calcium voltaje-gated channel subunit alpha 1B</i>	Cacna1b	AF055477	-	Donado por Dr. D. Lipscombe (EEUU)
Cav2.2-GFP	<i>calcium voltaje-gated channel subunit alpha 1B</i>	Cacna1b	AF055477	Ligado a GFP	Donado por Dr. G.W. Zamponi (Canadá)
Cav2.2 C-terminal (proximal)	<i>calcium voltaje-gated channel subunit alpha 1B</i>	Cacna1b	AF055477	Residuos 1706 al 1983	Generado en esta tesis

Cav3.1	<i>calcium voltage-gated channel subunit alpha 1G</i>	Cacna1g	AF190860	-	AddGene (EEUU) #45811
Cav3.2-GFP	<i>calcium voltage-gated channel subunit alpha 1H</i>	Cacna1h	NM_021098	Ligado a GFP	Donado por Dr. E. Bourinet (Francia)
Cav3.3	<i>calcium voltage-gated channel subunit alpha 1I</i>	Cacna1i	NM_021096	-	Donado por Dra. D. Lipscombe (EEUU)
Cavβ₃	<i>calcium voltage-gated channel auxiliary subunit beta3</i>	Cacnb3	M88751	-	Donado por Dra. D. Lipscombe (EEUU)
Cavα₂δ₁	<i>calcium voltage-gated channel auxiliary subunit alpha2delta</i>	Cacna2d1	AF286488	-	Donado por Dra. D. Lipscombe (EEUU)
D1R	<i>dopamine receptor D1</i>	DRD1	NM_000794	-	<i>cDNA Resource Center</i> (EEUU) #DRD0100000
D1R	<i>dopamine receptor D1</i>	DRD1	NM_000794	-	Donado por Dr. M. Tiberi (Canadá)
D1R-YFP	<i>dopamine receptor D1</i>	DRD1	NM_000794	Ligado a YFP	Generado en esta tesis

D1RS199A	<i>dopamine receptor D1</i>	DRD1	NM_000794	Con mutación puntual S199A	Generado en esta tesis
D1RS199A-YFP	<i>dopamine receptor D1</i>	DRD1	NM_000794	Con mutación S199A y ligado a YFP	Generado en esta tesis
D1RSTI	<i>dopamine receptor D1</i>	DRD1	NM_000794	Con mutación múltiple STI	Donado por Dr. M. Tiberi (Canadá)
D1R loop 1	<i>dopamine receptor D1</i>	DRD1	NM_000794	Residuos 52 al 57	Generado en esta tesis
D1R loop 2	<i>dopamine receptor D1</i>	DRD1	NM_000794	Residuos 118 al 138	Generado en esta tesis
Gα_q Q209L/D277N	<i>G protein subunit alpha q</i>	GNAQ	U40038	Con mutación Q209L/D277N	<i>cDNA Resource Center</i> (EEUU) #GNA0Q000X0

10. Electrofisiología

Realizamos los registros electrofisiológicos utilizando amplificadores EPC7 (*HEKA Elektronik, Alemania*) o Axopatch 200 (*Molecular Devices, EEUU*). Realizamos el muestreo de datos a 20 kHz, filtrados a 10 kHz (-3 dB) utilizando los programas PatchMaster (*HEKA Elektronik, Alemania*) o pClamp8.2 (*Molecular Devices, EEUU*); mediante un conversor analógico-digital Digidata 1322A (*Molecular Devices, EEUU*). Monitoreamos y compensamos la capacitancia de las células durante los registros. Monitoreamos las resistencias de acceso mediante un pulso de -10 mV. Descartamos registros en los que la resistencia de acceso hubiera aumentado >20 %. Sustrajimos la corriente de fuga de manera *online* utilizando un protocolo P/-4. Incluimos en el análisis únicamente los registros con un valor de corriente de fuga menor a 100 pA registrado al potencial de mantenimiento correspondiente para cada caso. Para construir cada set de datos, analizamos datos obtenidos a partir de 3 días experimentales independientes y 3 animales diferentes en el caso de los experimentos con animales.

10.1. Registros electrofisiológicos en rebanadas de cerebro

Visualizamos las rebanadas con un microscopio directo (*Zeiss Examiner.A1*), una lámpara de radiación infrarroja y una cámara digital (*Rolera Bolt Scientific CMOS; QImaging*). Identificamos neuronas piramidales de la capa 5/6 de las regiones prelímbica e infralímbica de la CPFm por ubicación y morfología (Yang et al., 1996). Realizamos registros electrofisiológicos en dichas neuronas por la técnica de *patch clamp* en configuración de célula entera con fijación de voltaje. Realizamos todos los registros a temperatura ambiente en solución aCSF con un flujo constante de 2,5 ml/min.

10.1.1. Corrientes de calcio en rebanadas de cerebro

Registramos las corrientes nativas de calcio por la técnica de *patch clamp* con fijación de voltaje con pulsos cuadrados desde un potencial de mantenimiento (-80 mV) hasta el potencial de activación correspondiente para cada caso. Para evocar las corrientes Ca_v HVA aplicamos pulsos de voltaje desde -80 mV a 0 mV de 100 ms de duración. Para evocar las corrientes Ca_v LVA aplicamos pulsos de voltaje desde -80 mV a -30 mV de 200 ms de duración. Usamos microelectrodos de registro de Ag/AgCl incluidos en micropipetas de vidrio/borosilicato con resistencias entre 4 y 8 M Ω y cargadas con una solución interna que contiene (en mM): 115 metanosulfonato de Cs, 20 cloruro de tetraetilamonio, 10 CsCl, 10 HEPES, 10 EGTA, 5 NaCl, 4 MgATP, 0,3 NaGTP. Para aislar las corrientes nativas de calcio Ca_v , añadimos el bloqueador de canales de sodio tetrodotoxina (TTX, 500 nM) a la solución externa (aCSF, 2,5 mM Ca^{2+}).

10.1.1. Corrientes postsinápticas en rebanadas de cerebro

Registramos las corrientes postsinápticas excitatorias e inhibitorias en neuronas piramidales de la capa 5/6 de la CPFm en rebanadas de cerebro de ratón. Utilizamos microelectrodos de registro de Ag/AgCl incluidos en micropipetas de vidrio/ borosilicato con resistencias entre 4 y 8 M Ω y cargadas con una solución interna con (en mM): 115 metanosulfonato de Cs, cloruro de tetraetilamonio, 4 Mg-ATP, 0,3 NaGTP, y 0,6 EGTA. Para registrar las EPSC e IPSC evocadas por estímulos eléctricos externos, adicionamos a la solución interna N-etil bromuro de lidocaína (QX-314, 10 mM), un inhibidor de los canales de sodio que no permea las membranas, para evitar el disparo de la neurona registrada. Estimulamos eléctricamente las neuronas con un electrodo unipolar (1 ms; 20 mA) ubicado en la capa 2/3 de la CPFm. Aplicamos estos estímulos manteniendo a las células a un potencial continuo de -70 mV o 0 mV para detectar corrientes EPSC o IPSC, respectivamente. Además, registramos las EPSC e IPSC miniatura (mEPSC y mIPSC) añadiendo TTX (500 nM) a la solución externa (aCSF).

Nuevamente, registramos las mEPSC a un potencial constante de -70 mV y las mIPSC a 0 mV, durante un tiempo mínimo de 5 minutos.

10.2. Registros electrofisiológicos en células HEK293T

Una vez transcurridas las 24 o 48 h luego de la transfección de las células HEK293T, según corresponde para la expresión de cada proteína, disgregamos las células con 0,9 mg/ml de tripsina y las mantuvimos en DMEM sin SFB a temperatura ambiente durante el día de experimento de *patch clamp*.

Realizamos experimentos de *patch clamp* en modo de fijación de voltaje y en configuración de célula entera para registrar corrientes mediadas por distintos subtipos de Ca_v ($Ca_v1.2$, $Ca_v1.3$, $Ca_v2.1$, $Ca_v2.2$, $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$) a temperatura ambiente. Usamos microelectrodos de registro de Ag/AgCl incluidos en micropipetas de vidrio/borosilicato con resistencias entre 2 y 5 M Ω y cargados con una solución intracelular con (en mM): 134 CsCl, 10 HEPES, 10 EGTA, 4 MgATP, 1 EDTA, pH 7,4. En todos los experimentos, empleamos un potencial de mantenimiento de -100mV.

Para registrar las corrientes mediadas por los Ca_v1 y los Ca_v2 , utilizamos una solución externa que contiene (en mM): 140 cloruro de colina, 10 HEPES, 1 MgCl₂·6H₂O y 2 CaCl₂·2H₂O (pH 7,4). Para evocar las corrientes iónicas aplicamos un pulso cuadrado de voltaje desde -100 mV a -10 mV (para $Ca_v1.3$), a 0 mV (para $Ca_v1.2$) o a +10 mV (para $Ca_v2.1-2$), de 30 ms de duración, seguido de un pulso a -60 mV (10 ms). Para evocar las corrientes iónicas Ca_v3 , utilizamos una solución externa que contiene (en mM): 10 BaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 140 cloruro de TEA y 6 CsCl (pH 7,4). Aplicamos un pulso cuadrado de voltaje desde -100 mV a -30 mV (para $Ca_v3.3$) o a -20 mV (para $Ca_v3.1-2$) de 200 ms de duración. Adicionalmente, registramos las corrientes de *ON gating* de $Ca_v2.2$ aplicando pulsos cuadrados desde -100 mV al potencial de reversión (V_{rev} , +60 mV aproximadamente). Determinamos el V_{rev} para cada célula calculando el punto de corriente cero en una curva de corriente-voltaje construida mediante pulsos cuadrados desde -100 mV hasta 70 mV (5 ms de duración con incrementos de 0,5 mV).

11. Mediciones de AMPc intracelular

11.1. Mediciones de AMPc intracelular basal

Realizamos mediciones de AMPc intracelular basal acumulado como fue descrito previamente (Agosti et al., 2017) en células HEK293T transfectadas. Fijamos los contenidos intracelulares 24 h luego de las transfecciones, removiendo los sobrenadantes y agregando 0,8 ml de etanol 90 % a cada pocillo. Al momento de las

mediciones, secamos el etanol y resuspendimos los residuos en 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,1% albúmina de suero bovino. Determinamos el contenido intracelular de AMPc mediante un ensayo de *radio-binding* competitivo para PKA, utilizando [3H]-AMPc como fue previamente descrito (Davio et al., 1995). Analizamos muestras duplicadas de al menos 3 experimentos independientes.

11.1. Mediciones de AMPc intracelular estimulado por ligando

Realizamos mediciones de AMPc intracelular estimulado por ligando en tiempo real usando la técnica de transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET, del inglés *fluorescence resonance energy transfer*) como fue descrito previamente (Carozzo et al., 2019). Brevemente, 48 h luego de la transfección de las células HEK Epac-S H187, lavamos las mismas dos veces con NaCl 0,9% y agregamos 100 μ l de *FluoroBrite* DMEM (*Thermofisher*) a cada pocillo antes de colocar la placa en el equipo *FlexStation*® 3 min a 37°C. Para determinar la respuesta de AMPc intracelular, en primer lugar, medimos la señal detectada a emisiones de 475 nm (donante) y 530 nm (FRET) con excitación a 430 nm. Luego de 40 s, agregamos 50 μ l de droga o vehículo (*FluoroBrite* DMEM) como se indica para cada *set* experimental. Monitoreamos la señal cada 20 s durante un total de 600 s, registrando las intensidades FRET y donante en cada punto. Calculamos la relación FRET/donante (R) y la normalizamos con respecto a los niveles basales previos a la estimulación (R_0) para cada punto de muestreo. Analizamos muestras duplicadas de al menos 3 experimentos independientes.

12. Análisis de imágenes en células HEK293T

Subcultivamos células HEK293T en una placa de cultivo de 35 mm de diámetro y a las 24 h las transfectamos con los correspondientes plásmidos. 24 h post-transfección, retiramos la placa de la estufa y reemplazamos el medio de cultivo por 1 ml de una solución 1 μ g/ml del marcador de membrana plasmática (*CellMaskTM Orange Plasma Membrane Stain, Invitrogen*) en medio de cultivo. Mantuvimos las células en estufa a 37°C durante 1 min, luego de lo cual retiramos la solución del marcador de membrana y enjuagamos tres veces con PBS a 37°C durante 1 min. A continuación, retiramos todo el líquido y colocamos un vidrio limpio de 22 x 22 mm sobre la placa.

Para visualizar los preparados y obtener imágenes utilizamos un microscopio óptico de epifluorescencia Nikon Eclipse 50i, equipado con cubo-filtros B2A y G2A y una cámara Nikon DS-Ri1 de tipo RGB. Para el análisis de imágenes utilizamos el software libre Fiji (ImageJ, EEUU) mediante el cual determinamos la fluorescencia como densidad integrada. La densidad integrada de fluorescencia es la suma de los valores de intensidad de los píxeles en la selección de interés, y es equivalente al producto entre

el área y la intensidad de fluorescencia media. Analizamos muestras duplicadas de al menos 3 experimentos independientes.

13. Análisis estadístico

Analizamos y graficamos los datos de este trabajo utilizando los programas *OriginPro 8* (*OriginLab Corp.*, EEUU) y *GraphPad Prism 6* (*GraphPad Software Inc.*, EEUU). En todos los sets de datos examinamos la distribución normal por el test de Kolmogorov-Smirnov y la homocedasticidad por el test de Barlett. Para datos con distribución normal utilizamos las siguientes pruebas estadísticas: test de t de Student de una muestra, de dos muestras independientes, ANOVA de una vía, con los post-test de Dunnett o Tukey, o ANOVA de dos vías, con el post-test de Sidak. Los datos que no siguieron una distribución normal, o para los que no fue posible demostrarla, fueron analizados mediante tests estadísticos no paramétricos: test de Mann-Whitney, test de Kruskal-Wallis con el post-test de Dunnett o el post-test de Tukey. Los valores de I_{tail} versus Q_{ON} se ajustaron a ecuaciones lineales con la ordenada al origen igual a cero. Las curvas de dosis-respuesta a dopamina, clorpromazina y haloperidol se ajustaron a ecuaciones de Hill. En ambos casos los ajustes y sus parámetros se compararon con el test F de Fisher. El test estadístico específico utilizado para cada set de datos y los valores p se indican en la leyenda de la figura correspondiente. Se consideró significancia estadística cuando $p < 0,05$.

Resultados

Capítulo 1: Estudio de las corrientes Cav nativas en neuronas de la corteza prefrontal y su sensibilidad a ligandos de receptores tipo-D1R.

En este capítulo exponemos los resultados correspondientes a los primeros dos objetivos de la tesis. Caracterizamos las corrientes de calcio nativas de neuronas piramidales de la CPFm de ratones y el efecto de la administración *in vivo* e *in vitro* de clorpromazina, un fármaco antipsicótico y agonista inverso de los receptores tipo-D1R. Exploramos la contribución de los distintos subtipos de Ca_v a la corriente total nativa y su sensibilidad a clorpromazina. Combinamos estos experimentos en neuronas *ex vivo* con ensayos en un sistema de expresión heteróloga para evaluar la sensibilidad de cada subtipo de Ca_v a la actividad basal de D1R, el receptor tipo-D1R más abundante en la CPFm.

Objetivo 1. Explorar el efecto de clorpromazina sobre las corrientes nativas Ca_v en neuronas piramidales de la CPFm.

Objetivo 2. Establecer la contribución de los diferentes subtipos de Ca_v a las corrientes de calcio nativas en la CPFm y su sensibilidad diferencial a la actividad constitutiva de receptores tipo-D1R.

Objetivo 1. Explorar el efecto de clorpromazina sobre las corrientes nativas Ca_v en neuronas piramidales de la CPFm.

En primer lugar, realizamos una serie de experimentos para explorar si los Ca_v neuronales son proteínas blanco de la actividad constitutiva de los receptores tipo-D1R y determinar específicamente qué subtipos son modulados en un contexto fisiológico, como es la CPFm. Para ello usamos al antipsicótico clorpromazina, un agonista inverso de los receptores tipo-D1R (Cai et al., 1999). Realizamos registros electrofisiológicos mediante la técnica de *patch clamp* en configuración de célula entera y con fijación de voltaje. Registramos *ex vivo* las corrientes Ca_v nativas en neuronas piramidales de la capa 5/6 de las regiones prelímbica e infralímbica de la CPFm (Yang et al., 1996) de ratones tratados IP con vehículo o clorpromazina (1 mg/kg), 24 horas antes del experimento, con un refuerzo 1 hora antes del sacrificio (Figura 4). Seleccionamos este protocolo de tratamiento ya que se demostró que la actividad constitutiva de otros GPCRs afecta en forma crónica las corrientes y el tráfico a membrana de los Ca_v (Agosti et al., 2017; Beedle et al., 2004; Mustafa et al., 2017) y en base a estudios en ratones en los que se reportó que la presencia de clorpromazina es detectable en plasma aún 24 horas luego de su administración sistémica (Shibanoki et al., 1984).

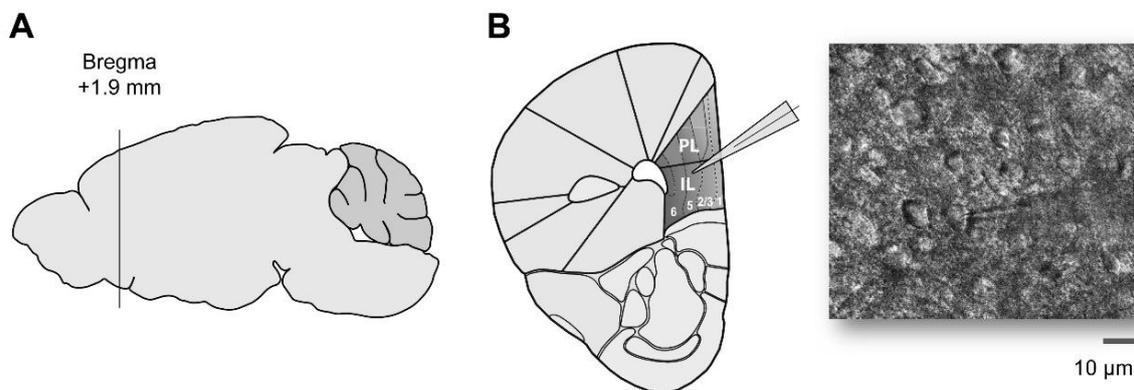


Figura 4. Experimentos de *patch clamp* en neuronas de la CPFm. **A.** Esquema de un cerebro de ratón en vista sagital, indicando la posición de la CPFm (línea). **B.** *Izquierda:* Esquema de rebanada coronal de un hemisferio de cerebro de ratón, con una micropipeta que contiene el electrodo de registro ubicada en la capa 5 de la CPFm (gris oscuro). PL: región prelímbica. IL: región infralímbica. *Derecha:* Fotografía del tejido visto con luz infrarroja, mostrando una micropipeta de registro haciendo contacto con una neurona piramidal de la capa 5/6 de la CPFm.

Comenzamos cada registro con aCSF y, luego de verificar la presencia y el tamaño adecuado de las corrientes de sodio (Na_v), añadimos TTX (500 nM), un bloqueante de los Na_v . Estudiamos las corrientes nativas Ca_v a dos voltajes diferentes: 0 mV, en donde esperamos encontrar una mayor contribución de las corrientes Ca_v activadas a altos voltajes (Ca_v HVA), y -30 mV, en donde esperamos tener una mayor contribución de las corrientes Ca_v activadas a bajos voltajes (Ca_v LVA) (Li et al., 1996). Observamos que las corrientes Ca_v HVA en ratones tratados con clorpromazina fueron significativamente menores que aquellas provenientes de animales tratados con vehículo (Figura 5A), mientras que las corrientes Ca_v LVA no se vieron afectadas (Figura 5B). Además, descartamos una acción aguda de clorpromazina (1 μM) sobre las corrientes Ca_v HVA provenientes de animales control (Figura 6). En los siguientes experimentos utilizamos una estrategia farmacológica para entender el rol de la actividad constitutiva de los receptores tipo-D1R en el efecto de clorpromazina en neuronas de la CPFm.

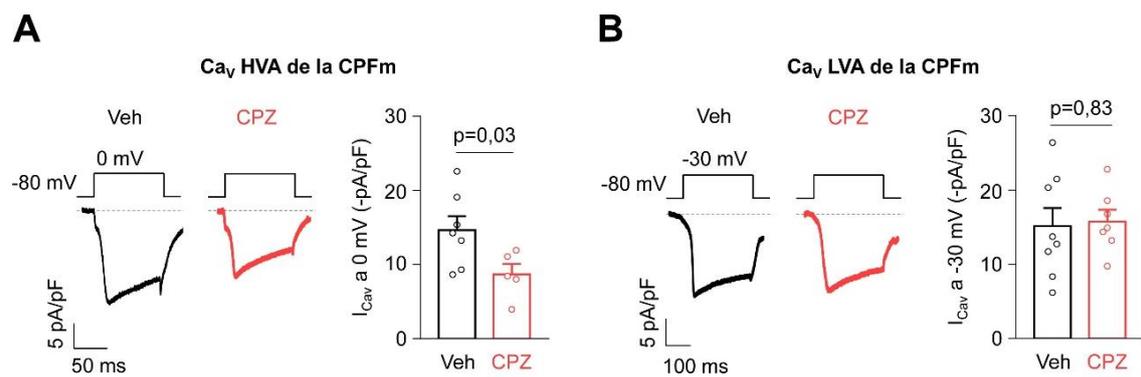


Figura 5. Clorpromazina, el agonista inverso de los receptores tipo-D1R, reduce exclusivamente las corrientes Ca_v evocadas a altos voltajes en neuronas de la CPFm. **A.** Trazos representativos y promedios de las corrientes Ca_v (I_{Ca_v}) evocadas a altos voltajes (0 mV, Ca_v HVA) registradas en neuronas piramidales de la capa 5/6 de rebanadas de CPFm provenientes de ratones tratados con vehículo (Veh, $n=7$) o clorpromazina (CPZ, 1mg/kg, $n=5$). Test de Mann-Whitney. **B.** Trazos representativos y promedios de las I_{Ca_v} evocadas a bajos voltajes (-30 mV, Ca_v LVA) registradas en neuronas piramidales de la capa 5/6 de rebanadas de CPFm provenientes de ratones tratados con vehículo (Veh, $n=8$) o CPZ ($n=7$). Test de t de Student no pareado.

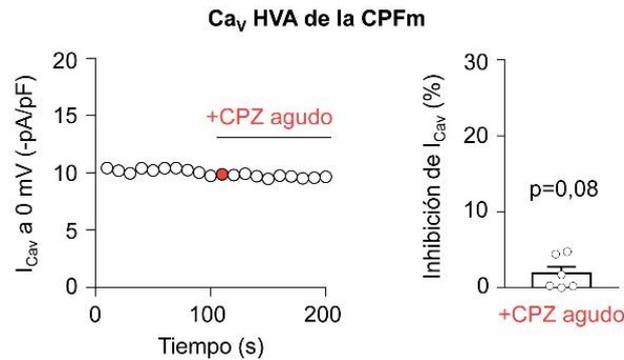


Figura 6. Clorpromazina no afecta en forma aguda a las corrientes Cav HVA nativas. Curso temporal representativo y promedio de los porcentajes de inhibición de las corrientes de calcio Cav (I_{cav}) evocadas a altos voltajes (0 mV, Cav HVA) luego de la aplicación aguda de clorpromazina (CPZ agudo, 1 μ M), en neuronas piramidales de la capa 5/6 de rebanadas de CPFm provenientes de ratones control (n=6). El punto coloreado en los cursos temporales indica el momento de aplicación de CPZ. Test de t de Student de una muestra *versus* 0.

Si bien numerosas evidencias demuestran el rol de clorpromazina como agonista inverso de D1R *in vitro*, es importante tener en cuenta que se trata de una droga inespecífica que aplicada IP podría estar actuando sobre otros blancos, tanto en la CPFm como en otras áreas cerebrales (Boyd-Kimball et al., 2018). Por este motivo, buscamos una estrategia farmacológica que nos permita evaluar (1) si el efecto que observamos cuando administramos clorpromazina de manera sistémica se debe a su acción local en la CPFm y (2) si clorpromazina actúa específicamente sobre los receptores tipo-D1R presentes en las neuronas de esta área. Realizamos una combinación de inyecciones intra-CPFm de inyecciones IP como se observa en la Figura 7. En primer lugar, evaluamos el efecto de clorpromazina administrada directamente en la CPF de animales previamente canulados. Además, administramos intra-CPF el antagonista específico de D1R y D5R, SCH23390, en conjunto con clorpromazina IP, para indagar si este ligando es capaz de ocluir el efecto del agonista inverso en neuronas de la CPFm (Cai et al., 1999). Elegimos a SCH23390 porque es altamente específico para D1R y D5R y presenta una afinidad por los mismos mayor que dopamina y clorpromazina (Neiens et al., 2015). Entonces, realizamos inyecciones intra-CPF con: vehículo, clorpromazina (1 μ g/animal) o SCH23390 (1 μ g/animal) (0.5 μ l/animal), acompañados de una solución de fluoroesferas para verificar la llegada de la mezcla de inyección a la zona deseada (24 horas antes del sacrificio). Adicionalmente, realizamos inyecciones IP de vehículo o clorpromazina (1 mg/kg) (22 horas y 1 hora antes del sacrificio). En el día del experimento, sacrificamos a los animales, obtuvimos rebanadas coronales y realizamos experimentos de *patch clamp* para registrar las corrientes Cav

HVA en neuronas piramidales de la CPFm. En la Figura 8 se puede observar que clorpromazina administrada intra-CPF tiene un efecto similar al observado cuando se aplica sistémicamente, reduciendo significativamente la amplitud de las corrientes Ca_v HVA en comparación con el control tratado con vehículo. Además, observamos que la administración de SCH23390 en la CPF restituyó los niveles de corriente Ca_v HVA a niveles control en animales tratados con clorpromazina IP, sin modificar los niveles de corriente en animales tratados IP con vehículo. Así, estos resultados demuestran que el antagonista tipo-D1R SCH23390 es capaz de prevenir el efecto de clorpromazina sobre las corrientes Ca_v HVA y sugieren que clorpromazina actúa localmente en la CPFm como agonista inverso de los receptores tipo-D1R.

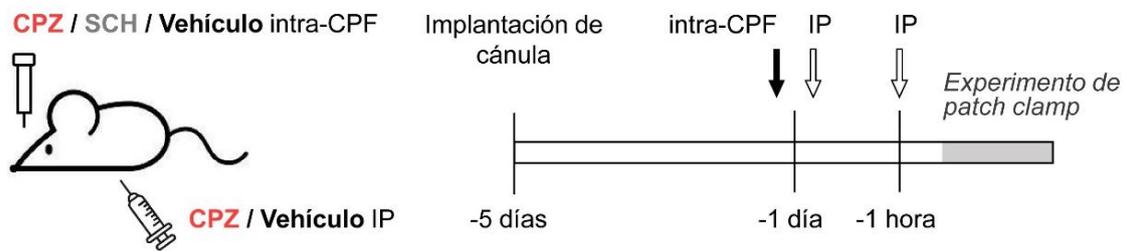


Figura 7. Diseño experimental de inyecciones combinadas para la administración intra-CPFm o IP de vehículo, clorpromazina y/o SCH23390. Los ratones fueron previamente operados para la implantación de cánulas en la CPFm (día -5). Los animales fueron tratados intra-CPFm con aCSF (Vehículo), SCH23390 (SCH, 1 μ g/animal) o clorpromazina (CPZ, 1 μ g/animal) (24 h antes del sacrificio), en combinación con inyecciones IP de NaCl 0,9 % (Vehículo), o CPZ (1 mg/kg) (22 h antes del sacrificio, con 1 refuerzo 1 h antes del sacrificio). Los ratones fueron sacrificados para extraer los cerebros y realizar los registros electrofisiológicos (experimento de *patch clamp*).

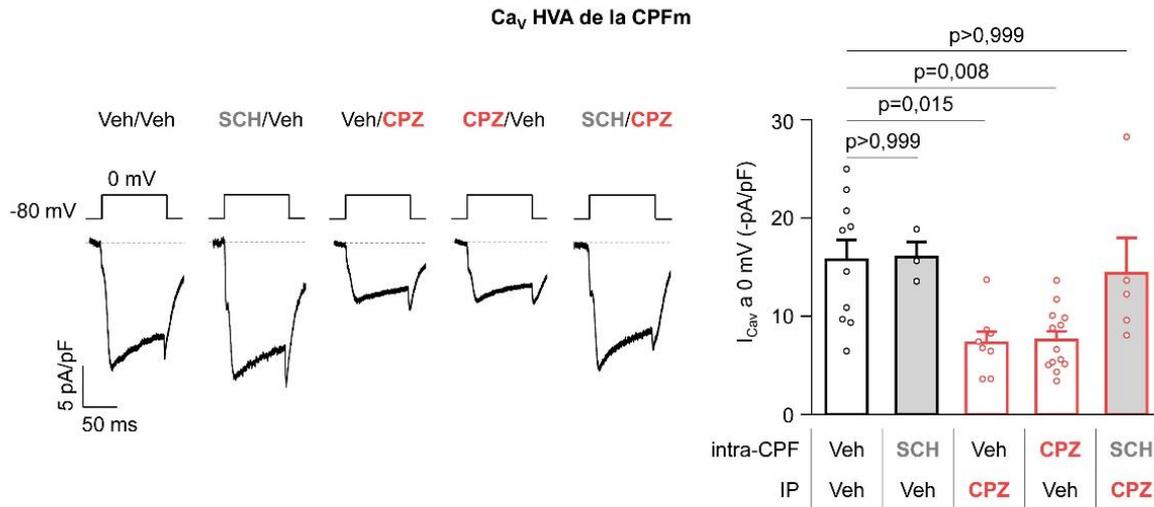


Figura 8. La administración del antagonista SCH23390 intra-CPFm previene el efecto de clorpromazina IP sobre las corrientes Ca_v HVA. Trazos representativos y promedios de las corrientes Ca_v (I_{cav}) evocadas a altos voltajes (0 mV, Ca_v HVA) en neuronas piramidales de la capa 5/6 de rebanadas de CPFm provenientes de ratones tratados intra-CPF e IP con vehículo (Veh), SCH23390 (SCH, 1 μ g/animal) y/o clorpromazina (CPZ, 1 μ g/hemisferio o 1 mg/kg), como se indica en la Figura 7 (Veh/Veh, n=10; SCH/Veh, n=3; Veh/CPZ, n=8; CPZ/Veh, n=13; SCH/CPZ, n=5;). Test de Kruskal-Wallis con el post-test de Dunnet (Veh/Veh).

En conjunto, nuestros resultados hasta aquí demuestran que clorpromazina, un agonista inverso de los receptores tipo-D1R, ocluye el efecto estimulador de la actividad constitutiva de estos receptores sobre las corrientes Ca_v HVA en neuronas piramidales de la CPFm.

Objetivo 2. Establecer la contribución de los diferentes subtipos de Ca_v a las corrientes de calcio nativas en la CPFm y su sensibilidad diferencial a la actividad constitutiva de receptores tipo-D1R.

Como mencionamos previamente, existen varios subtipos de Ca_v que contribuyen a la corriente nativa global en neuronas y participan de distintas funciones neuronales (Catterall, 2011). Así, consideramos importante explorar cuáles son los Ca_v modulados por la actividad constitutiva de los receptores tipo-D1R. En los siguientes experimentos evaluamos la contribución de distintos subtipos de canales a la corriente Ca_v nativa sensible al tratamiento IP con clorpromazina en las neuronas piramidales de la CPFm. En paralelo a nuestros ensayos en neuronas realizamos experimentos en un sistema de expresión heteróloga para evaluar individualmente la sensibilidad de cada subtipo Ca_v a la actividad constitutiva de D1R.

Comenzamos nuestro estudio enfocados en el subtipo $Ca_v2.2$, ya que se reportó que D1R aumenta la densidad de esta proteína en la membrana postsináptica de neuronas piramidales de la CPFm (Kisilevsky et al., 2008; Westebroek et al., 1992). Para evaluar el efecto sobre las corrientes $Ca_v2.2$, registramos las corrientes Ca_v HVA en animales tratados con vehículo, SCH23390 y/o clorpromazina y aislamos la corriente sensible a ω -conotoxina GVIA, un bloqueante específico de $Ca_v2.2$ (Figura 9A). Observamos que clorpromazina, ya sea administrada IP o intra-CPFm, redujo drásticamente la sensibilidad de las corrientes Ca_v HVA a ω -conotoxina GVIA. Interesantemente, la administración intra-CPFm de SCH23390 previno la acción de clorpromazina IP, mientras que el SCH23390 no modificó por sí solo la sensibilidad de las corrientes al bloqueante específico de $Ca_v2.2$. Así, observamos una menor contribución del subtipo $Ca_v2.2$ a las corrientes nativas Ca_v HVA provenientes de animales tratados con clorpromazina en comparación con animales control, efecto que fue ocluido por la administración previa de SCH23390. Estos resultados sugieren que la actividad constitutiva de los receptores tipo-D1R aumenta la contribución del subtipo $Ca_v2.2$ a las corrientes nativas en neuronas de la CPFm.

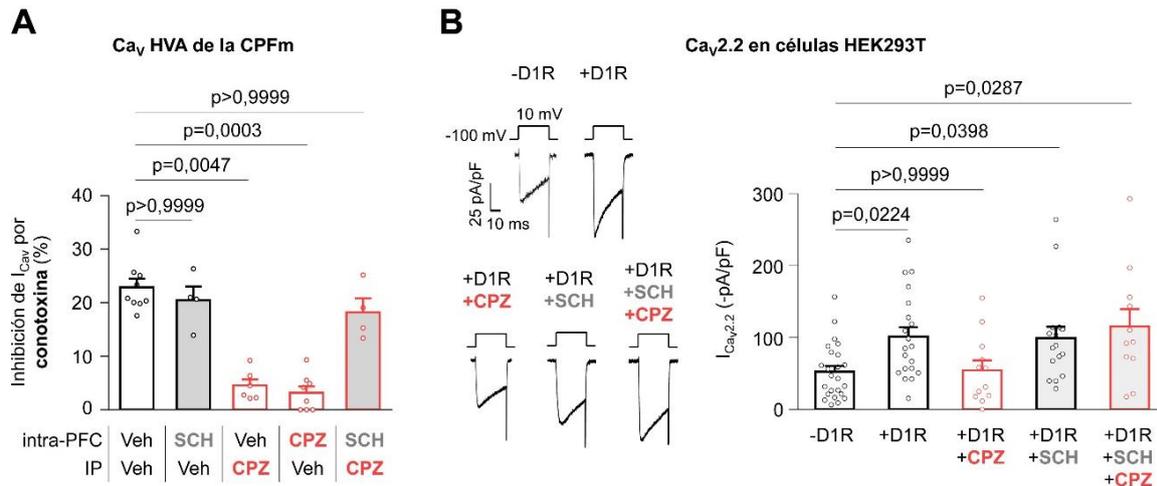


Figura 9. Clorpromazina reduce las corrientes Ca_v2.2 a través de la actividad de D1R en ausencia de dopamina. **A.** Promedios de los porcentajes de inhibición de las corrientes de calcio Ca_v (I_{Cav}) evocadas a altos voltajes (0 mV, Cav HVA) luego de la aplicación aguda de ω-conotoxina GVIA (conotoxina, 1 μM), registradas en neuronas piramidales de la capa 5/6 de rebanadas de CPFm provenientes de ratones tratados intra-CPFm e IP con vehículo (Veh), SCH23390 (SCH, 1 μg/animal) y/o clorpromazina (CPZ, 1 μg/animal o 1 mg/kg), como se indica en la Figura 7. (Veh/Veh, n=9; SCH/Veh, n=4; Veh/CPZ, n=6; CPZ/Veh, n=8; SCH/CPZ, n=4). Test de Kruskal-Wallis con post-test de Dunnet (Veh/Veh). **B.** Trazos representativos y promedios de las corrientes Ca_v2.2 (I_{Ca_v2.2}) registradas en células HEK293T transfectadas con Ca_v2.2 y sus subunidades auxiliares, en ausencia (-D1R, n=24) o presencia de D1R control (+D1R, n=20) o preincubadas con CPZ (1 μM) y/o SCH (1 μM) (+CPZ, n=12; +SCH, n=16; +SCH+CPZ, n=11). Test de Kruskal-Wallis con post-test de Dunnet (-D1R).

Luego, quisimos explorar el efecto de esta estrategia farmacológica usada *in vivo* en un sistema controlado de expresión heteróloga. Para ello utilizamos células HEK293T transfectadas, un modelo que ha sido empleado eficazmente en el laboratorio para estudiar la actividad constitutiva de otros GPCRs (Agosti et al., 2017; Cordisco Gonzalez et al., 2020; Lopez Soto et al., 2015; Mustafa et al., 2017). Realizamos experimentos de *patch clamp* en configuración de célula entera y con fijación de voltaje, y registramos las corrientes basales en células transfectadas con Ca_v2.2 y sus subunidades auxiliares, en ausencia o presencia de D1R, el receptor tipo-D1R más abundante en la CPFm (Figura 9B). Observamos que las células que expresan D1R presentan niveles de corriente significativamente mayores que las corrientes control transfectadas con canal solo. Además, preincubamos las células transfectadas con Ca_v2.2 y D1R con SCH23390 y/o clorpromazina y encontramos que el agonista inverso de D1R previno el aumento de las corrientes Ca_v2.2 generado por la coexpresión de D1R, pero no tuvo efecto en células coincubadas con SCH23390. En resumen, encontramos que la coexpresión de D1R aumenta la amplitud de las corrientes Ca_v2.2 y que este efecto fue

coherentemente modulado por ligandos que actúan como agonista inverso y antagonista, lo que sugiere que se encuentra asociado a la actividad constitutiva de D1R. Estos resultados *in vitro* recapitulan nuestras observaciones en rebanadas de CPFm, demostrando la sensibilidad específica del $Ca_v2.2$ a la actividad de D1R y apoyando el uso *in vivo* de esta estrategia farmacológica.

A continuación, evaluamos el efecto de clorpromazina sobre los Ca_v1 neuronales ($Ca_v1.2$ y $Ca_v1.3$), otros subtipos que contribuyen a las corrientes Ca_v HVA en los somas de las neuronas corticales (Sinnegger-Brauns et al., 2009). En la figura 10A exploramos el porcentaje de corriente sensible a nifedipina ($10 \mu\text{M}$), una dihidropiridina que bloquea mayormente a los canales Ca_v1 (Lee et al., 2006), en rebanadas de CPFm provenientes de animales tratados con vehículo, clorpromazina y/o SCH23390. Observamos que clorpromazina, ya sea administrada IP o intra-CPFm, redujo significativamente la sensibilidad de estas corrientes a nifedipina. En contraste para lo observado para el $Ca_v2.2$, la administración intra-CPFm del antagonista específico SCH23390 fue incapaz de prevenir el efecto inhibitorio de clorpromazina, sugiriendo que la menor contribución de Ca_v1 a las corrientes Ca_v HVA en neuronas de animales tratados con clorpromazina es independiente de la actividad constitutiva de los receptores tipo-D1R. Luego, exploramos esta posibilidad evaluando los niveles de corriente basal en células HEK293T transfectadas con $Ca_v1.2$ o $Ca_v1.3$ en ausencia o presencia de D1R, pero no encontramos efecto de la coexpresión de D1R sobre ninguno de los dos subtipos (Figura 10B y Figura 10C). En conjunto, estos resultados sugieren que la actividad basal de los receptores tipo-D1R no modula los niveles de corriente Ca_v1 ni en neuronas de la CPFm ni en células HEK293T transfectadas. Dado que se han descrito efectos inhibitorios de clorpromazina y otros antipsicóticos sobre las corrientes Ca_v1 (Ito et al., 1996; Ogata et al., 1990), analizamos el efecto crónico y agudo de clorpromazina sobre $Ca_v1.3$, el subtipo de Ca_v1 más abundante en la corteza cerebral de ratón (Sinnegger-Brauns et al., 2009). Transfectamos células HEK293T con $Ca_v1.3$ y sus subunidades accesorias y las preincubamos con clorpromazina durante 44 horas para evaluar un efecto a largo plazo. Observamos que los niveles de corriente basal fueron drásticamente menores en células preincubadas con clorpromazina en comparación con células control (Figura 11A). Además, aplicamos clorpromazina de manera aguda en células transfectadas con $Ca_v1.3$ y encontramos que inhibe significativamente estas corrientes (Figura 11B). En base a este resultado hubiéramos esperado que clorpromazina tuviese un efecto agudo sobre las Ca_v HVA en neuronas de la CPFm (Figura 6). Esta diferencia puede deberse a que en rebanadas de cerebro muchas veces es necesario aplicar concentraciones

mayores de las drogas en comparación con cultivos celulares. Estos resultados revelan que los $Ca_v1.2$ y $Ca_v1.3$ no son modulados por la actividad constitutiva de D1R y que clorpromazina bloquea de manera fuerte y directa a los canales $Ca_v1.3$ en un sistema de expresión heterólogo.

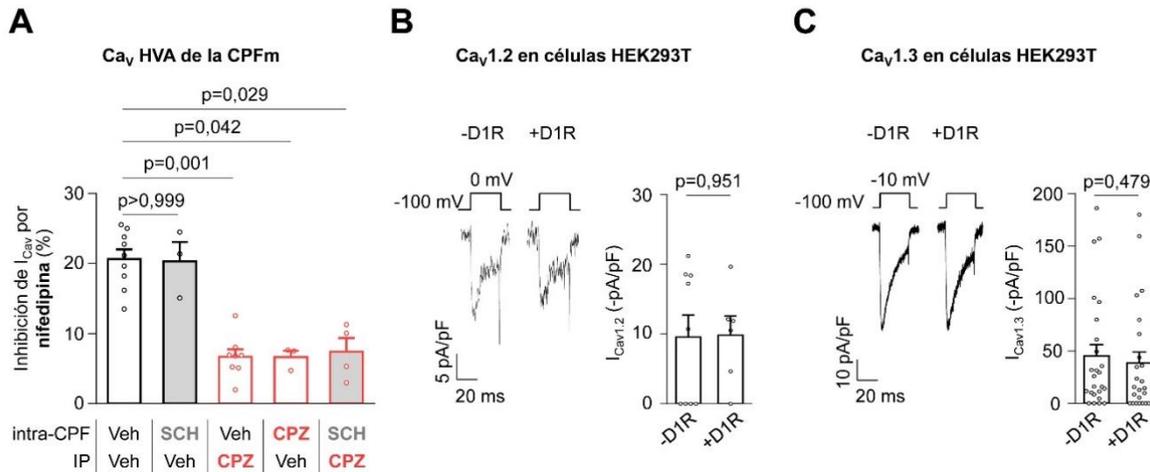


Figura 10. Clorpromazina inhibe los Ca_v1 independientemente de la actividad de D1R. **A.** Promedios de los porcentajes de inhibición de las corrientes de calcio Ca_v (I_{Ca_v}) evocadas a altos voltajes (0 mV, Ca_v HVA) luego de la aplicación aguda de nifedipina (10 μ M), registradas en neuronas piramidales de la capa 5/6 de rebanadas de CPFm provenientes de ratones tratados intra-CPF e IP con vehículo (Veh), SCH23390 (SCH, 1 μ g/animal) y/o clorpromazina (CPZ, 1 μ g/animal o 1 mg/kg), como se indica en la Figura 7 (Veh/Veh, n=9; SCH/Veh, n=3; Veh/CPZ, n=8; CPZ/Veh, n=3; SCH/CPZ, n=4). Test de Kruskal-Wallis con el post-test de Dunnet (Veh/Veh). **B.** Trazos representativos y promedios de las corrientes $Ca_v1.2$ ($I_{Ca_v1.2}$) registradas en células HEK293T transfectadas con $Ca_v1.2$ y sus subunidades accesorias, en ausencia (-D1R, n=9) o presencia de D1R (+D1R, n=6). Test de Mann-Whitney. **C.** Trazos representativos y promedios de las corrientes $Ca_v1.3$ ($I_{Ca_v1.3}$) registradas en células HEK293T transfectadas con $Ca_v1.3$ y sus subunidades auxiliares, en ausencia (-D1R, n=25) o presencia de D1R (+D1R, n=24). Test de Mann-Whitney.

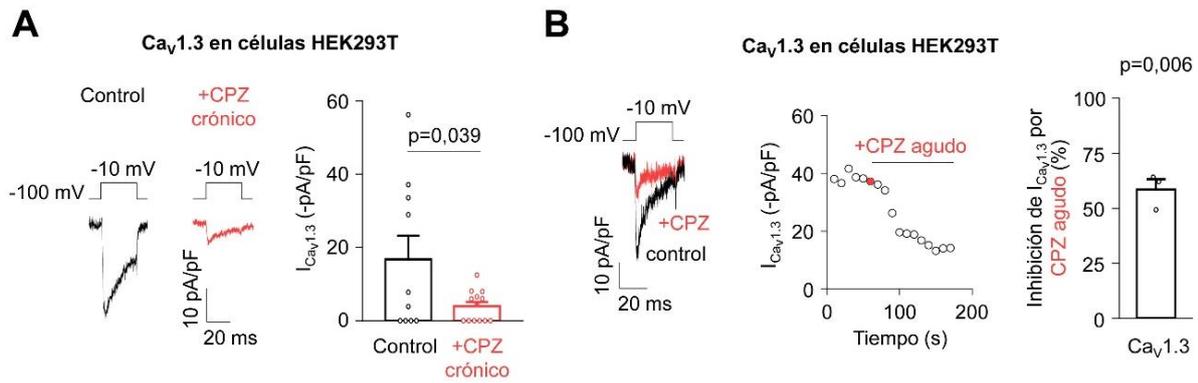


Figura 11. Clorpromazina tiene un efecto inhibitorio directo sobre los Cav1.3. **A.** Trazos representativos y promedios de corrientes Cav1.3 ($I_{Cav1.3}$) en células HEK293T transfectadas con Cav1.3 y sus subunidades auxiliares, preincubadas o no con clorpromazina (CPZ, $1\mu\text{M}$) (Control, $n=10$; +CPZ crónico, $n=13$). Test de t de Student no pareado. **B.** Trazos representativos, curso temporal representativo y promedio de los porcentajes de inhibición de las corrientes Cav1.3 ($I_{Cav1.3}$) luego de la aplicación aguda de clorpromazina (+CPZ agudo, $1\mu\text{M}$, $n=3$), registradas en células HEK293T transfectadas con Cav1.3 y sus subunidades auxiliares. El punto coloreado en el curso temporal indica el momento de aplicación de CPZ. Test de t de una muestra *versus* 0.

Otro subtipo de canal activado a altos voltajes es el $\text{Ca}_v2.1$. A continuación, evaluamos la sensibilidad de estas corrientes a ω -agatoxina IVA, un bloqueante específico de los $\text{Ca}_v2.1$, en neuronas provenientes de animales tratados con vehículo o clorpromazina. Encontramos que las corrientes Ca_v HVA fueron insensibles a ω -agatoxina IVA tanto en animales controles como en los tratados con clorpromazina (test de Mann-Whitney, $p>0,999$) (Figura 12A). Este resultado puede ser explicado debido a que el $\text{Ca}_v2.1$ se encuentra enriquecido en sitios presinápticos y que en nuestras rebanadas coronales se habría eliminado la mayor proporción de los axones de neuronas piramidales de la capa 5/6. Además, evaluamos el efecto de la coexpresión de D1R sobre las corrientes basales mediadas por $\text{Ca}_v2.1$ en células HEK293T transfectadas y no observamos un efecto significativo de D1R sobre estas corrientes (Figura 12B). Así, nuestros resultados indican que los $\text{Ca}_v2.1$ no contribuyen de manera significativa a las corrientes de Ca_v HVA en nuestras condiciones experimentales, ya sea en animales tratados IP con vehículo o con clorpromazina, y que las corrientes $\text{Ca}_v2.1$ recombinantes no se ven afectadas por la coexpresión de D1R.

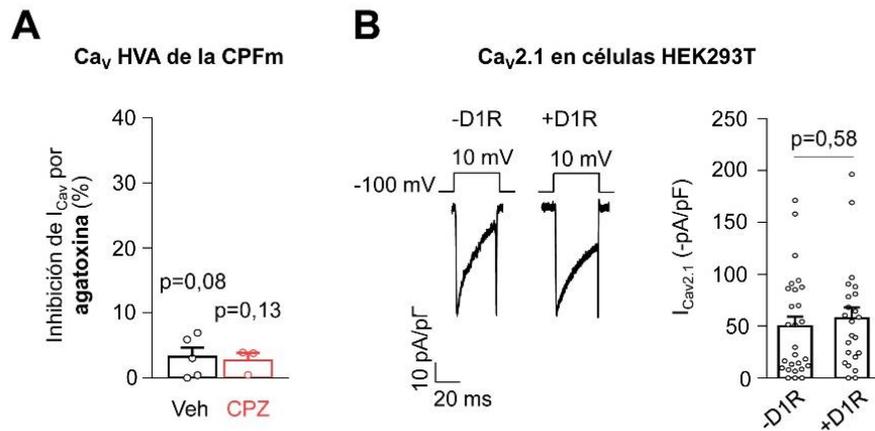


Figura 12. Los Cav2.1 no contribuyen significativamente a las corrientes Cav HVA nativas de la CPFm, ni son afectadas por la coexpresión de D1R en células HEK293T. A. Promedios de los porcentajes de inhibición de las corrientes de calcio Cav (I_{Ca_v}) evocadas a altos voltajes (0 mV, Ca_v HVA) luego de la aplicación aguda de ω-agatoxina IVA (1 μM), registradas en neuronas piramidales de la capa 5/6 de rebanadas de CPFm provenientes de ratones tratados IP con vehículo (Veh, n=5), o clorpromazina (CPZ, 1mg/kg, n=3). Test de t de Student de una muestra *versus* 0. **B.** Trazos representativos y promedios de las corrientes Ca_v2.1 (I_{Ca_v2.1}) registradas en células HEK293T transfectadas con Ca_v2.1 y sus subunidades auxiliares, en ausencia (-D1R, n=27) o presencia de D1R (+D1R, n=23). Test de t de Student no pareado.

Para completar la caracterización de los subtipos de Ca_v sensibles a clorpromazina y a la actividad basal de los tipo-D1R, decidimos estudiar a los Ca_v3, los canales típicamente activados a bajos voltajes. Exploramos la contribución de las corrientes Ca_v3 a las corrientes Ca_v nativas evocadas a -30mV (Ca_v LVA). Para ello, utilizamos níquel a 100 μM. Si bien se ha demostrado que una concentración de níquel de 100 μM bloquea a los Ca_v3 (Mlinar & Enyeart, 1993) y a los Ca_v2.3 (Zamponi et al., 1996), esperamos que a -30 mV la contribución de los Ca_v3 sea mayoritaria. Aplicamos níquel (NiCl₂) a las corrientes Ca_v LVA registradas en neuronas piramidales provenientes de animales control o tratados con clorpromazina y observamos que la sensibilidad de las corrientes a níquel no se ve alterada, siendo de ~60 % en ambas condiciones experimentales (Figura 13A). A continuación, exploramos el efecto de la coexpresión de D1R sobre los tres subtipos de canales Ca_v3 (Ca_v3.1, Ca_v3.2 y Ca_v3.3) en células HEK293T transfectadas. Registramos las corrientes basales en cada condición y observamos que la presencia de D1R no modificó la amplitud de las corrientes mediadas por ninguno de estos canales (Figuras 13B, 13C, 13D). Estos resultados demuestran que los subtipos Ca_v3 no son blanco de la actividad constitutiva de D1R ni son afectados por clorpromazina.

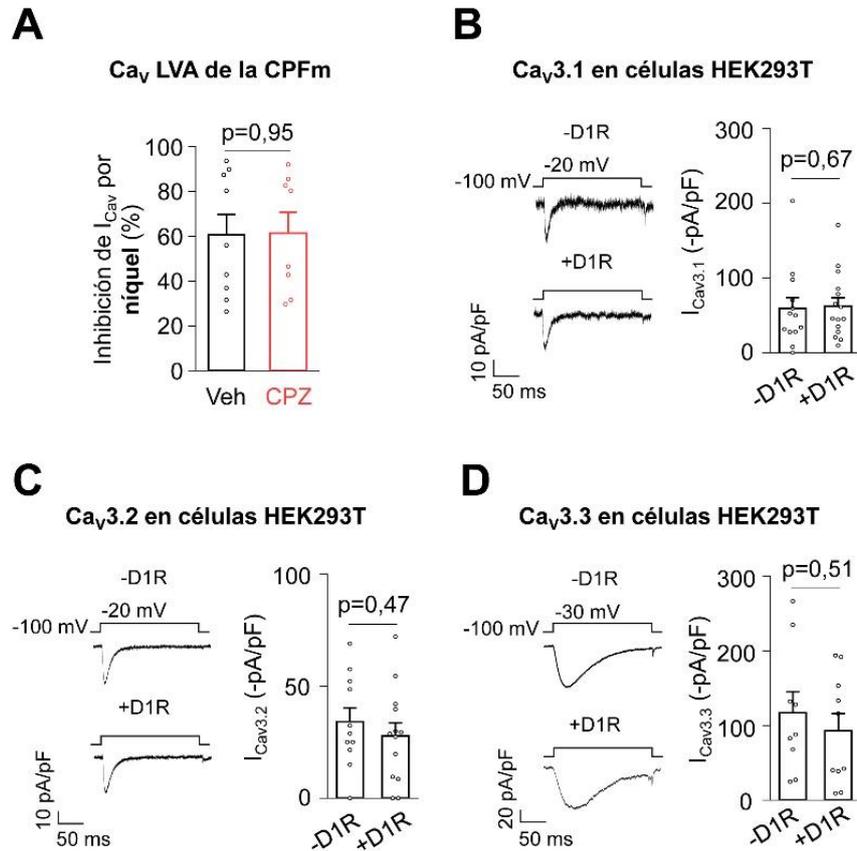


Figura 13. Los Cav3 no son modulados ni por clorpromazina ni por la coexpresión de D1R. A. Promedios de los porcentajes de inhibición de las corrientes de calcio Ca_v (I_{Ca_v}) evocadas a bajos voltajes (-30 mV, Ca_v LVA) luego de la aplicación aguda de $NiCl_2$ (níquel 100 μM), registradas en neuronas piramidales de la capa 5/6 de rebanadas de CPFm provenientes de ratones tratados IP con vehículo (Veh, $n=9$), o clorpromazina (CPZ, 1 mg/kg, $n=8$). Test de Mann-Whitney. B. Trazos representativos y promedios de las corrientes $Ca_v3.1$ ($I_{Ca_v3.1}$) registradas en células HEK293T transfectadas con $Ca_v3.1$ en ausencia (-D1R, $n=13$) o presencia de D1R (+D1R, $n=15$). Test de Mann-Whitney. C. Trazos representativos y promedios de las corrientes $Ca_v3.2$ ($I_{Ca_v3.2}$) registradas en células HEK293T transfectadas con $Ca_v3.2$ en ausencia (-D1R, $n=11$) o presencia de D1R (+D1R, $n=13$). Test de t de Student no pareado. D. Trazos representativos y promedios de las corrientes $Ca_v3.3$ ($I_{Ca_v3.3}$) registradas en células HEK293T transfectadas con $Ca_v3.3$ en ausencia (-D1R, $n=9$) o presencia de D1R (+D1R, $n=10$). Test de t de Student no pareado.

Hasta este punto, logramos caracterizar los subtipos de Ca_v que contribuyen a las Ca_v nativas en nuestras condiciones experimentales y obtuvimos resultados que sugieren que la actividad constitutiva de D1R modula selectivamente las corrientes $Ca_v2.2$, mientras que clorpromazina presenta un efecto inhibitorio directo sobre los Ca_v1 , independiente de su acción como agonista inverso de los receptores tipo-D1R.

Si bien en la figura 9 mostramos que SCH23390 es capaz de bloquear el efecto de clorpromazina sobre las corrientes $Ca_v2.2$, decidimos realizar experimentos adicionales para validar el uso del SCH23390 como antagonista de dopamina en nuestro sistema experimental. Para ello, estudiamos la capacidad de SCH23390 de bloquear el efecto estimulador de dopamina sobre los niveles de AMPc intracelular y el efecto inhibitorio de dopamina sobre las corrientes $Ca_v2.2$. Primero, registramos el aumento de AMPc intracelular mediante la técnica FRET en tiempo real en células HEK transfectadas con D1R o plásmido vacío luego de la aplicación de dopamina y/o SCH23390. Observamos que el antagonista fue capaz de prevenir el aumento de AMPc intracelular generado por dopamina, mientras que no tuvo efecto por sí solo (Figura 14). Además, transfectamos células HEK293T con $Ca_v2.2$, sus subunidades accesorias y D1R, registramos las corrientes mediante *patch clamp* y aplicamos en forma aguda dopamina en ausencia o presencia de SCH23390 en el baño extracelular (Figura 15A). En ausencia del antagonista, dopamina inhibió las corrientes de calcio (~35 %) y este efecto se vio significativamente reducido en presencia de SCH23390 (Figura 15B).

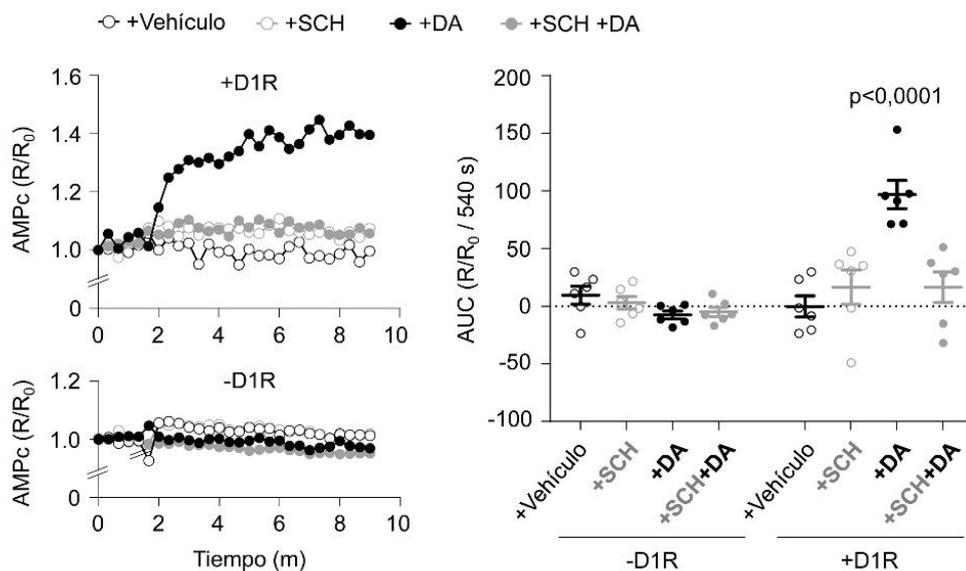


Figura 14. El antagonista SCH23390 previene el aumento de AMPc intracelular inducido por dopamina en células HEK293T. A. Cursos temporales representativos del aumento de AMPc intracelular registrado mediante FRET en tiempo real en células HEK293T transfectadas con D1R (+D1R) o plásmido vacío (-D1R), luego de la aplicación aguda de dopamina (DA, 1 μ M), SCH23390 (SCH, 1 μ M) y/o DMEM (vehículo). **B.** AUC (del inglés *Area Under Curve*) representa el área bajo la curva acumulada a 540 segundos (9 min) para cada condición (n=6 para cada condición). Test de Kruskal-Wallis con el post-test de Dunnet (-D1R+Vehículo) (sólo se indica el valor de p para la comparación significativamente diferente).

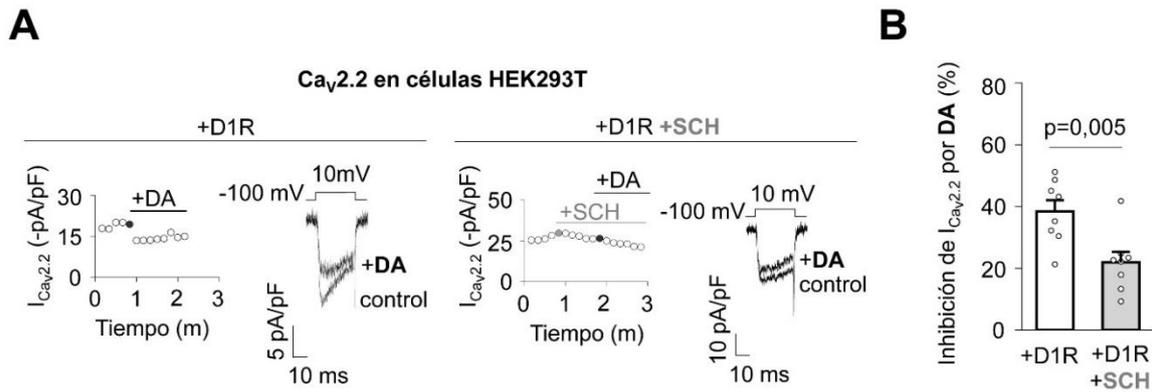


Figura 15. SCH23390 reduce el efecto de la actividad evocada por dopamina del D1R sobre las corrientes heterólogas Cav2.2. **A.** Cursos temporales y trazos representativos de las corrientes Cav2.2 ($I_{Ca_{v2.2}}$) luego de la aplicación aguda de dopamina (+DA, 10 μ M) sola o con la aplicación previa de SCH23390 (+SCH, 10 μ M), en células HEK293T transfectadas con Cav2.2, sus subunidades accesorias y D1R. Los puntos coloreados en los cursos temporales indican el momento de aplicación de las drogas. **B.** Promedios de inhibición de las corrientes $I_{Ca_{v2.2}}$ luego de la aplicación aguda dopamina (DA) en ausencia (+D1R, n=8) o presencia de SCH23390 (+D1R+SCH, n=8). Test de t de Student no pareado.

Siendo que SCH23390 no tuvo efecto crónico ni agudo sobre nuestro blanco de interés, los Ca_v2.2, decidimos investigar el efecto crónico del antagonista en presencia de dopamina sobre estas corrientes. Para ello, transfectamos células con Ca_v2.2, sus subunidades accesorias y D1R y las preincubamos con dopamina sola o dopamina junto con SCH23390. Observamos que el tratamiento con dopamina redujo drásticamente las corrientes Ca_v2.2 basales y que la coincubación con SCH23390 revirtió parcialmente este efecto (Figura 16). Esta disminución de las corrientes causada por dopamina era esperable ya que se reportó que dopamina produce la internalización de los canales mediada por D1R (Kisilevsky et al., 2008). La cointernalización del canal y el receptor llevaría a una menor densidad de Ca_v2.2 en la membrana y una menor disponibilidad de los mismos para abrirse ante estímulos despolarizantes. En este caso, el SCH23390 está antagonizando el efecto de dopamina y, posiblemente, previniendo la internalización del complejo D1R-Ca_v2.2. Es importante destacar que estos registros fueron realizados en ausencia de dopamina en el baño extracelular, apoyando la idea de que el efecto se deba a la cointernalización de ambas proteínas previamente descrita.

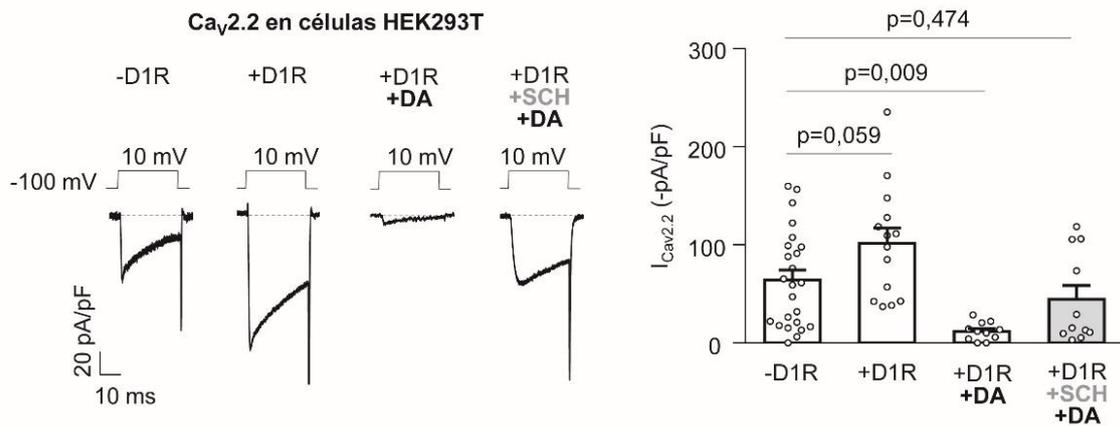


Figura 16. El SCH23390 antagoniza el efecto crónico de dopamina sobre las corrientes Cav2.2 mediado por D1R. Trazos representativos y promedios de las corrientes basales Cav2.2 ($I_{Ca_v2.2}$) registradas en células HEK293T transfectadas con Cav2.2 y sus subunidades auxiliares, en ausencia (-D1R, n=24) o presencia de D1R control (+D1R, n=14) o preincubadas con dopamina (DA, 1 μ M) y/o SCH23390 (SCH, 1 μ M) (+D1R+DA, n=11; +D1R+SCH+DA, n=11). ANOVA de una vía con el post-test de Dunnet (-D1R).

A continuación, medimos el efecto de clorpromazina sobre la producción basal de AMPc intracelular por D1R y testeamos cómo ésta es modulada por SCH23390. Transfectamos células HEK293T con plásmido vacío o con D1R y las preincubamos con clorpromazina y/o SCH23390 durante 20 horas. Como se ve en la figura 17, la expresión de D1R generó un aumento del contenido de AMPc intracelular basal en comparación con el control (sin D1R). Como esperábamos, clorpromazina redujo el contenido de AMPc en presencia de D1R. En células preincubadas con SCH23390, encontramos un sorprendente aumento del AMPc basal, independientemente de la presencia o ausencia de clorpromazina. Este resultado plantea la posibilidad de que el SCH23390 tenga efectos adicionales a su probado antagonismo neutral, como su agonismo parcial observado en ensayos de AMPc. En base a las figuras 9, 15 y 16, creemos que este mecanismo no es suficiente para modular las corrientes Cav2.2. Sería importante tener en cuenta este aspecto de su farmacología si quisiéramos utilizarlo en futuros experimentos.

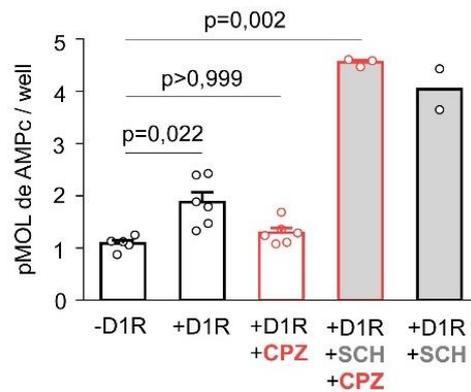


Figura 17. Clorpromazina y SCH23390 modulan el nivel de AMPc basal en células que expresan D1R. Mediciones del contenido de AMPc intracelular basal (en ausencia de dopamina), en células HEK293T transfectadas con plásmido vacío (-D1R, n=5) o D1R control (+D1R, n=6) o preincubadas con clorpromazina (+CPZ, 1 μ M) y/o SCH23390 (+SCH, 1 μ M) (+D1R+CPZ, n=6; +D1R+SCH+CPZ, n=3; +D1R+SCH, n=2). Test de Kruskal-Wallis con el post-test de Dunnet (-D1R).

Finalmente, presentamos datos adicionales donde ensayamos el efecto de otros antipsicóticos sobre la corriente $Ca_v2.2$ sensible a la coexpresión de D1R. Si bien la síntesis de clorpromazina a principios de la década del '50 catalizó el desarrollo de la psicofarmacología y dio origen a una primera generación de fármacos antipsicóticos (Boyd-Kimball et al., 2018), éste no es el único fármaco antipsicótico para el que se ha reportado agonismo inverso sobre D1R y D5R (Zhang et al., 2014). Algunos años después se introdujo haloperidol a la práctica clínica, otro antipsicótico de primera generación (López-Muñoz & Alamo, 2009) que continúa siendo uno de los antipsicóticos más utilizados a nivel mundial. En este contexto, decidimos evaluar si haloperidol logra prevenir el efecto de la actividad constitutiva de D1R sobre los $Ca_v2.2$ al igual que lo visto para clorpromazina. Para ello, transfectamos células HEK293T con $Ca_v2.2$ y sus subunidades accesorias en ausencia o presencia de D1R y las preincubamos con clorpromazina u haloperidol. Encontramos que ambos antipsicóticos ocuyen de igual forma el efecto estimulador de D1R sobre las corrientes $Ca_v2.2$ sin afectar los niveles de corriente en células control (sin D1R) (Figura 18A y 18B). A continuación, decidimos evaluar la acción de risperidona, un antipsicótico de segunda generación, sobre el efecto de D1R en nuestro sistema experimental. Registramos las corrientes $Ca_v2.2$ basales en células transfectadas con o sin D1R, preincubadas o no con risperidona. Encontramos que esta droga no tuvo efecto sobre los canales en ausencia de D1R y observamos una tendencia a que risperidona prevenga el efecto de D1R sobre los canales, aunque este último no fue estadísticamente significativo, probablemente debido al tamaño de los sets

de datos analizados en este caso (Figura 18C). Este resultado sugiere que risperidona podría actuar como agonista inverso de la actividad basal de D1R, aunque esto debería ser confirmado mediante ensayos bioquímicos. En resumen, pudimos modular la actividad constitutiva de D1R y su efecto sobre los $Ca_v2.2$ utilizando diferentes fármacos antipsicóticos que actuarían como agonistas inversos.

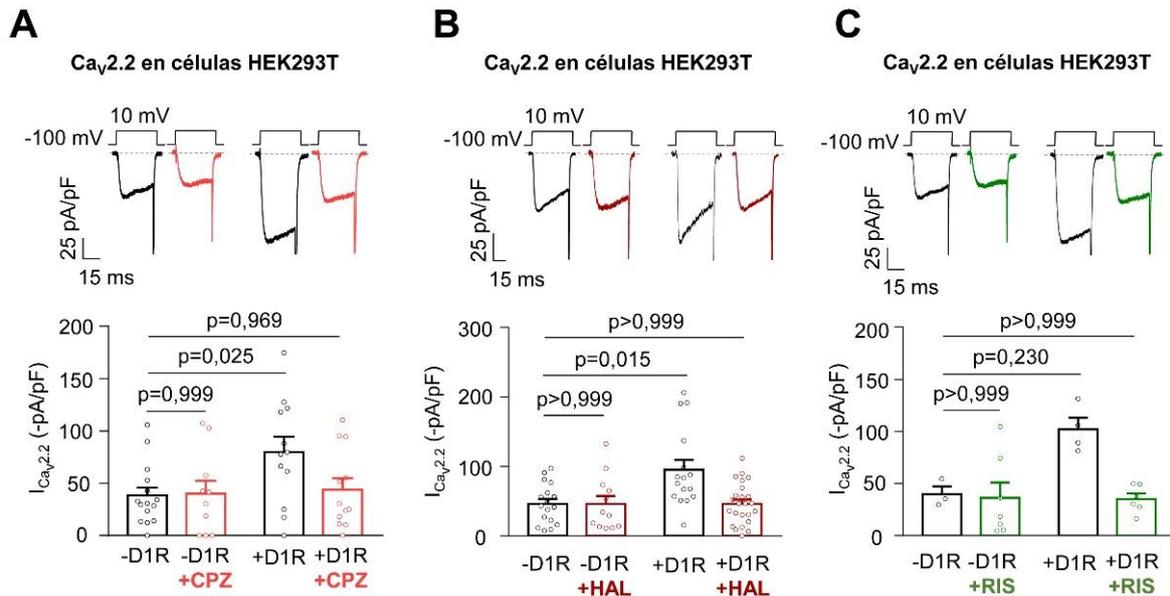


Figura 18. Distintos fármacos antipsicóticos revierten el efecto estimulador de la coexpresión de D1R sobre los $Ca_v2.2$. **A.** Trazos representativos y promedios de corrientes $Ca_v2.2$ ($I_{Ca_v2.2}$) en células HEK293T transfectadas con $Ca_v2.2$ y sus subunidades auxiliares, con o sin D1R, preincubadas o no con clorpromazina (CPZ, 1 μ M) (-D1R, n=15; -D1R +CPZ, n=10; +D1R, n=12; +D1R +CPZ, n=12). ANOVA de una vía con el post-test de Dunnet (-D1R). **B.** Trazos representativos y promedios de corrientes $Ca_v2.2$ ($I_{Ca_v2.2}$) en células HEK293T transfectadas con $Ca_v2.2$ y sus subunidades auxiliares, con o sin D1R, preincubadas o no con haloperidol (HAL, 1 μ M) (-D1R, n=17; -D1R +HAL, n=16; +D1R, n=24; +D1R +HAL, n=12). Test de Kruskal-Wallis con el post-test de Dunnet (-D1R). **C.** Trazos representativos y promedios de corrientes $Ca_v2.2$ ($I_{Ca_v2.2}$) en células HEK293T transfectadas con $Ca_v2.2$ y sus subunidades auxiliares, con o sin D1R, preincubadas o no con risperidona (RIS, 10 μ M) (-D1R, n=3; -D1R +RIS, n=7; +D1R, n=4; +D1R +RIS, n=6). Test de Kruskal-Wallis con el post-test de Dunnet (-D1R).

Estudios previos reportaron que clorpromazina y haloperidol son capaces de bloquear distintos canales iónicos (Ogata et al., 1990; Santi et al., 2002; Tarabová et al., 2009) y, en el caso de haloperidol, se vio que inhibe en forma aguda y reversible a los $Ca_v2.2$ en algunas condiciones experimentales (Zamponi, 1999). En la figura 18 presentamos controles de células incubadas con los antipsicóticos en ausencia de D1R. Durante estos registros las células se encuentran rodeadas de una solución externa control, en ausencia de los antipsicóticos. Aquí, decidimos evaluar el efecto de la

aplicación aguda de clorpromazina y haloperidol sobre corrientes $Ca_v2.2$ en ausencia de D1R (Figura 19A). Construimos las curvas de dosis-respuesta correspondientes para cada droga (Figura 19B). Encontramos que la aplicación aguda de haloperidol inhibe las corrientes $Ca_v2.2$ y observamos que en algunas células este efecto se revierte en un $\sim 90\%$ al lavarlas con solución externa. Estos resultados indican que haloperidol posee un efecto inhibitorio directo, agudo y reversible sobre los $Ca_v2.2$, sin efectos crónicos sobre las mismas. Por el contrario, la aplicación aguda de clorpromazina no inhibió significativamente las corrientes $Ca_v2.2$. Estos datos demuestran que a pesar de su efecto directo sobre las corrientes Ca_v1 , clorpromazina es un ligando útil para estudiar el efecto de la actividad constitutiva de D1R sobre los $Ca_v2.2$.

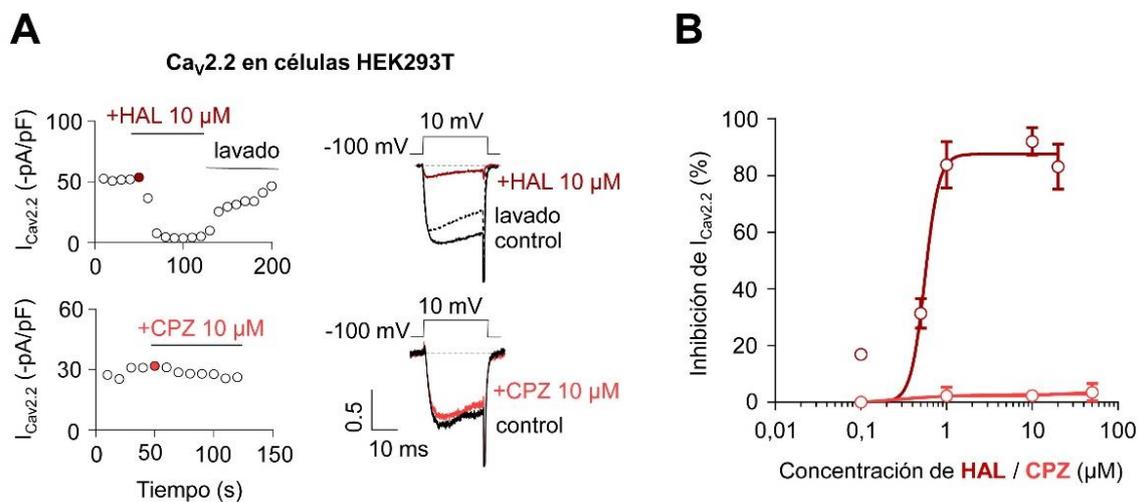


Figura 19. Haloperidol inhibe directamente las corrientes $Ca_v2.2$, mientras que clorpromazina no tiene efecto. **A.** Cursos temporales y trazos representativos de las corrientes $Ca_v2.2$ ($I_{Ca_v2.2}$) luego de la aplicación aguda de haloperidol (HAL, 10 µM) o clorpromazina (CPZ, 10 µM) en células HEK293T transfectadas con $Ca_v2.2$ y sus subunidades auxiliares. El punto coloreado en los cursos temporales indica el momento de aplicación de las drogas. Las corrientes se encuentran normalizadas a la amplitud máxima de corriente control. **B.** Curvas de dosis-respuesta de inhibición de las $I_{Ca_v2.2}$ por la aplicación aguda de concentraciones crecientes de HAL o CPZ. Ajuste con ecuaciones de Hill. HAL: Inhibición máx.=87,58 %; EC_{50} =0,56 µM; r^2 = 0,87; n=9. CPZ: Inhibición máx.=2,84 %; EC_{50} =0,19 µM; r^2 =0,19; n=7.

En resumen, en este capítulo de resultados caracterizamos las conductancias que contribuyen a las corrientes Ca_v nativas de neuronas piramidales ubicadas en la capa 5/6 de la CPFm y su sensibilidad a ligandos que pueden modular la actividad constitutiva de los receptores tipo-D1R. Nuestros resultados sugieren que el fármaco antipsicótico clorpromazina reduce las corrientes Ca_v HVA en neuronas piramidales de la CPFm mediante dos mecanismos diferentes: uno que involucra a la actividad basal de tipo-D1R y afecta a los $Ca_v2.2$, y otro independiente de la de tipo-D1R que reduce

las corrientes Ca_v1 . En base a los resultados presentados en las figuras 18 y 19, para los próximos experimentos de esta tesis decidimos continuar usando clorpromazina como agonista inverso de la actividad de los receptores tipo-D1R. Considerando nuestras observaciones en rebanadas de CPFm ex vivo y en células HEK293T, determinamos que las corrientes $Ca_v2.2$ son selectivamente sensibles a la actividad constitutiva de los receptores tipo-D1R. En el siguiente capítulo indagaremos en el mecanismo intracelular involucrado en este efecto.

Resultados

Capítulo 2: Caracterización del efecto de la actividad constitutiva de D1R sobre las corrientes Cav2.2 en un sistema de expresión heteróloga.

En este capítulo describimos los resultados obtenidos en el abordaje del tercer objetivo específico de la tesis doctoral. Empleamos un sistema de expresión heteróloga y realizamos experimentos para estudiar el efecto de la actividad constitutiva de D1R sobre las corrientes tipo $Ca_v2.2$ y el mecanismo intracelular involucrado.

Objetivo 3. Investigar aspectos del mecanismo celular involucrado en el aumento de las corrientes $Ca_v2.2$ por la coexpresión de D1R, utilizando un sistema de expresión heteróloga.

Los resultados presentados en el capítulo anterior sugieren que el receptor D1R genera un aumento en las corrientes $Ca_v2.2$ como consecuencia de su actividad constitutiva. En esta instancia, quisimos profundizar en este estudio para caracterizar el efecto de la coexpresión de D1R sobre las corrientes $Ca_v2.2$ e indagar en aspectos del mecanismo intracelular involucrado.

Una estrategia para modificar la cantidad de actividad constitutiva un GPCR es modulando la cantidad de receptores que señalizan basalmente expresados en la célula. Como fue demostrado para otros GPCRs con actividad constitutiva reportada, el grado de señalización basal se relaciona fuertemente con el nivel de expresión del receptor (Costa & Cotecchia, 2005; Lopez Soto et al., 2015). Aquí, caracterizamos el efecto de D1R sobre las corrientes de calcio $Ca_v2.2$ en función del nivel de expresión del receptor. Primero, verificamos que el nivel de expresión del receptor aumenta al cambiar la cantidad de ADNc codificante para el D1R en la transfección. Para ello, utilizamos 3 concentraciones de D1R (11ng, 23 ng que corresponde a la cantidad que usamos en el capítulo 1, y 115 ng). Utilizamos un clon de D1R fusionado a la proteína fluorescente YFP y tratamos a las células con un marcador de membrana plasmática que fluoresce en el rojo (*CellMaskTM*). Como era esperado, la intensidad de señal D1R-YFP en la membrana plasmática aumentó de manera directamente proporcional a la cantidad de D1R transfectada (Figura 20). Luego, realizamos ensayos de *patch clamp* en configuración de célula entera con fijación de voltaje en células HEK293T transfectadas con cantidades crecientes de D1R y una concentración fija de los plásmidos que contienen la subunidad principal de $Ca_v2.2$ y sus subunidades accesorias. Para ello, seleccionamos cantidades de D1R equivalentes a una proporción molar D1R: $Ca_v2.2$ que varía entre 0,05 y 1 (en donde 0,05 equivale a 11 ng de D1R y 1 equivale a 230 ng de D1R). Evocamos las corrientes con pulsos cuadrados desde -100 mV a +10 mV. De manera interesante, encontramos que la amplitud de las corrientes aumentó de manera concomitante con el incremento en la cantidad de D1R transfectado hasta un máximo en la proporción D1R: $Ca_v2.2$ igual a 0,1 (equivalente a 23 ng de D1R) (Figura 21). A concentraciones de D1R mayores a esta proporción el efecto se revirtió llegando incluso a obtenerse corrientes significativamente menores al control (sin D1R) en la proporción D1R: $Ca_v2.2$ igual a 1. De esta manera, la expresión de D1R tiene un efecto dual sobre las corrientes $Ca_v2.2$: mientras que niveles bajos e intermedios de expresión de D1R generan un aumento en estas corrientes, niveles elevados de expresión de D1R tendrían un efecto inhibitorio sobre las mismas. A continuación, nos enfocamos en

entender el mecanismo del efecto estimulador de la coexpresión de D1R sobre los Cav2.2 en relación a nuestras observaciones en neuronas de la CPFm.

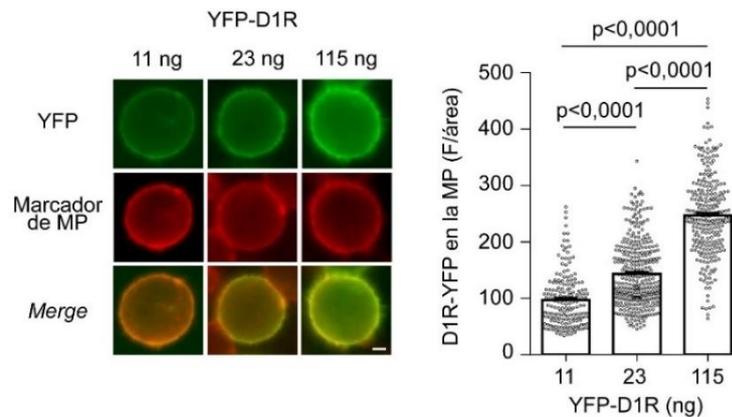


Figura 20. Los niveles de expresión de D1R aumentan de manera proporcional a la cantidad de ADNc transfectado. Microfotografías representativas y promedios de la intensidad de fluorescencia YFP (F) en la membrana plasmática (MP) normalizada por el área, en células HEK293T transfectadas con 11 ng (n=181), 23 ng (n=335) o 115 ng (n=254) de D1R-YFP y tratadas con el marcador de MP CellMask™. Escala 1 μ m. Test Kruskal-Wallis con post-test de Tuckey.

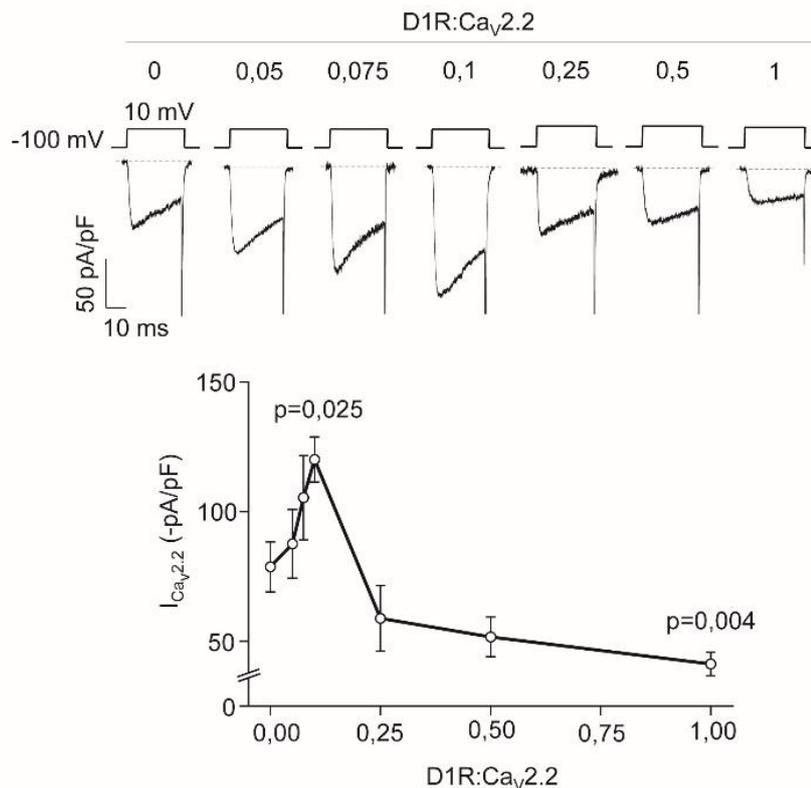


Figura 21. La coexpresión de D1R modifica las corrientes basales Cav2.2 en forma dual. Trazos representativos y promedio de corrientes basales Cav2.2 ($I_{Ca_v2.2}$) en células HEK293T transfectadas con Cav2.2 y sus subunidades auxiliares, en ausencia o presencia de cantidades crecientes de D1R, calculadas como la proporción molar entre D1R y Cav2.2 (D1R:Ca_v2.2) (D1R:Ca_v2.2 0; n=36) (D1R:Ca_v2.2 0,05; n=14) (D1R:Ca_v2.2 0,075; n=12) (D1R:Ca_v2.2 0,1; n=59) (D1R:Ca_v2.2 0,25; n=9) (D1R:Ca_v2.2 0,5; n=7) (D1R:Ca_v2.2 1; n=68). Test de Kruskal-Wallis con el post-test de Dunnet (D1R:Ca_v2.2 0).

Para comprobar que el aumento de las corrientes $Ca_v2.2$ por la expresión de D1R (proporción molar 0,1) se debe a la acción de su actividad constitutiva, realizamos experimentos de *patch clamp* reemplazando el D1R salvaje por dos mutantes de D1R que carecen de actividad constitutiva: el D1RS199A, que posee una mutación puntual de una serina por alanina en la posición 199 (Al-Fulaij et al., 2008), y el D1RSTI, que posee múltiples mutaciones en todas las serinas y treoninas presentes en el segmento IL-1 y la región de unión a los segmentos transmembrana contiguos (Zhang et al., 2015). El receptor mutado D1RS199A fue obtenido en nuestro laboratorio en base a datos previamente publicados (Al-Fulaij et al., 2008), mientras que el D1RSTI y su control con D1R salvaje fueron cordialmente donados por el Dr. Mario Tiberi (Universidad de Ottawa, Canadá).

En primer lugar, realizamos experimentos de epifluorescencia y mediciones de AMPc intracelular acumulado para validar el mutante generado en nuestro laboratorio. Transfectamos células HEK293T con el D1R salvaje o el mutante D1RS199A fusionados a la proteína fluorescente YFP y realizamos ensayos de microscopía confirmando que esta mutación puntual no modifica los niveles de expresión del receptor (Figura 22A). A su vez, realizamos mediciones de AMPc basal y comprobamos que el mutante D1RS199A produce niveles basales de AMPc menores que D1R salvaje e iguales a la condición control sin receptor, lo que confirma su actividad constitutiva reducida (-D1R $10,56 \pm 1,91$ pmol de AMPc, $n=3$; +D1R $21,65 \pm 0,13$ pmol de AMPc, $n=3$; +D1RS199A $13,99 \pm 2,39$ pmol de AMPc, $n=3$; ANOVA de una vía, $p=0,025$). Luego, registramos corrientes de calcio $Ca_v2.2$ en presencia del D1R salvaje o el D1RS199A y encontramos que la amplitud de corriente en células transfectadas con D1RS199A (Figura 22B) fue igual a la condición control con canal solo. De manera similar, observamos que el mutante D1RSTI no tuvo efecto sobre las corrientes $Ca_v2.2$ en comparación con el D1R salvaje (Figura 23) En conjunto, estos resultados muestran que las versiones de D1R que carecen de actividad constitutiva no afectan las corrientes de calcio mediadas por $Ca_v2.2$ y confirman la participación de la actividad constitutiva de D1R en la regulación positiva de estas corrientes.

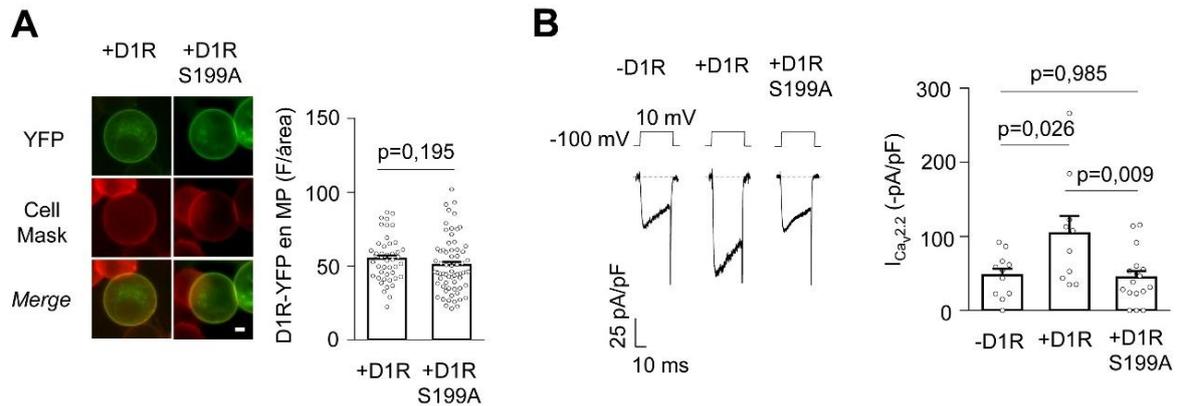


Figura 22. El mutante D1RS199A que carece de actividad constitutiva no tiene efecto sobre las corrientes Cav2.2. **A.** Microfotografías representativas y promedios de la intensidad de fluorescencia YFP (F) presente en la membrana plasmática (MP) y normalizada por el área, en células HEK293T transfectadas con D1R-YFP salvaje (n=45) o D1RS199A-YFP (n=66) y tratadas con el marcador de MP *CellMask*TM. Escala 1 μ m. Test de t de Student no pareado. **B.** Trazos representativos y promedios de las corrientes Cav2.2 ($I_{Cav2.2}$) en células HEK293T transfectadas con Cav2.2 y sus subunidades auxiliares, en ausencia (-D1R, 11) o en presencia de D1R salvaje (n=10) o D1RS199A (n=17). ANOVA de una vía con el post-test de Tuckey.

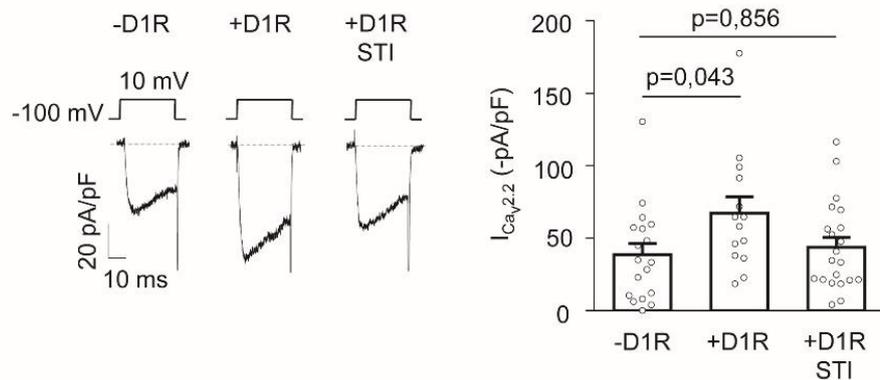


Figura 23. El mutante D1R STI, que carece de actividad constitutiva, no tiene efecto sobre las corrientes Cav2.2. Trazos representativos y promedios de las corrientes basales Cav2.2 ($I_{Cav2.2}$) en células HEK293T transfectadas con Cav2.2 y sus subunidades auxiliares, solo (-D1R, n=18) o con D1R salvaje (n=14) o D1R STI (n=21). ANOVA de una vía con el post-test de Dunnet (-D1R).

A continuación, indagamos en el mecanismo intracelular involucrado en el efecto estimulador independiente de agonista de D1R sobre los Cav2.2. Primero, estudiamos si este efecto depende de una interacción física previamente reportada entre el canal y el D1R (Kisilevsky et al., 2008). En este trabajo, los autores demuestran que el segmento intracelular *loop 2* de D1R interacciona físicamente con el fragmento proximal del extremo C-terminal del Cav2.2, y esta interacción física estimularía el tráfico de ambas

proteínas a la membrana plasmática. Aquí, utilizamos plásmidos que contienen la secuencia que codifica para el péptido *loop 2* de D1R, para la región C-terminal (proximal) de $Ca_v2.2$ y para el péptido *loop 1* de D1R (utilizado como control negativo). Estas secuencias fueron donadas por el Dr. Gerald Zamponi (Universidad de Calgary, Canadá), originalmente incluidas en el plásmido de expresión bacteriana pGEX-5.1 e posteriormente clonadas en plásmidos de expresión en mamíferos pcDNA3.1(+) en nuestro laboratorio para realizar las transfecciones de células HEK293T. En los experimentos planteados a continuación, sobre-expresamos el péptido *loop 2* para que compita con el D1R completo y desfavorezca su posible interacción con el canal. De manera similar, sobre-expresamos el péptido $Ca_v2.2$ C-terminal para desfavorecer la interacción del canal completo con el D1R.

Mediante experimentos de *patch clamp*, registramos corrientes $Ca_v2.2$ en células control (sin D1R) o con D1R, en ausencia o presencia del *loop 1* de D1R, el *loop 2* de D1R o la región C-terminal de $Ca_v2.2$ (Figura 24). En estos ensayos, la cantidad de plásmido adicionada a la mezcla de transfección fue 5 veces mayor para los péptidos cortos (*loop 1*, *loop 2* o el $Ca_v2.2$ C-terminal) en comparación con el D1R, para asegurar la sobre-expresión de los mismos. Encontramos que la sobre-expresión del *loop 2* del D1R o del $Ca_v2.2$ C-terminal ocluye el aumento de las corrientes $Ca_v2.2$ por la actividad constitutiva de D1R (Figuras 24A y 24B), mientras que la co-expresión de D1R *loop 1* no tiene efecto (Figura 24C). Para descartar una disminución de la señalización basal de D1R por los *loops* de D1R, transfectamos células con plásmido vacío, con D1R solo, con D1R y el péptido *loop 2* o con D1R y el péptido *loop 1* y medimos el contenido de AMPc intracelular basal. Encontramos que la coexpresión del *loop 2* o del *loop 1* no altera significativamente el aumento de AMPc intracelular generado por la actividad constitutiva de D1R (Figura 25).

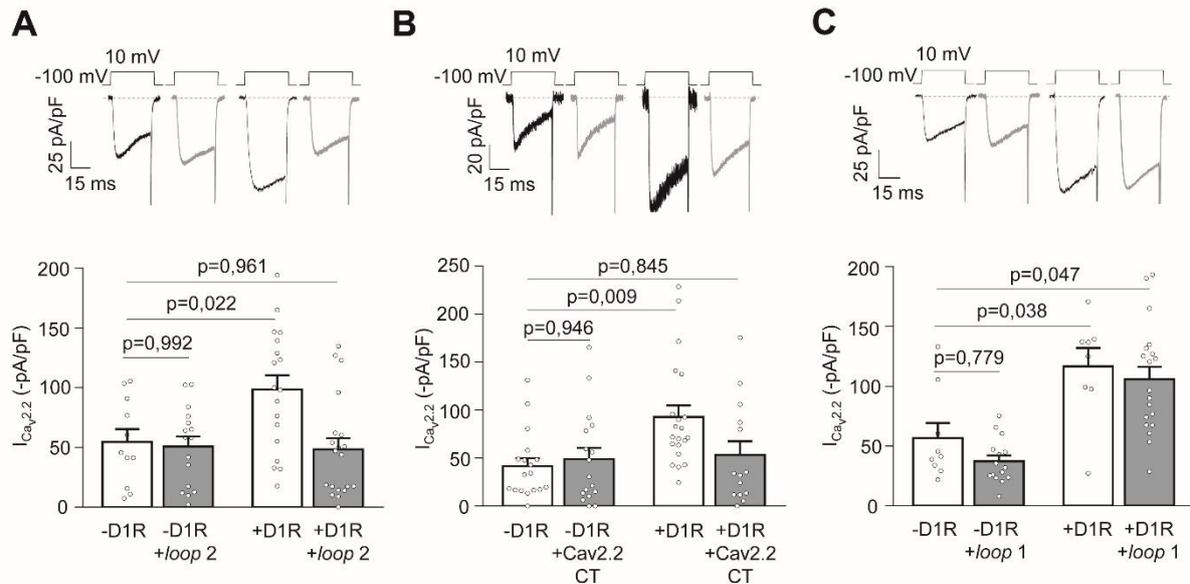


Figura 24. Los péptidos cortos que interrumpen la interacción física entre D1R y Cav2.2 ocuyen el efecto de la coexpresión de D1R sobre las corrientes Cav2.2. **A.** Trazos representativos y promedios de corrientes basales Cav2.2 ($I_{Cav2.2}$) en células HEK293T transfectadas con Cav2.2 y sus subunidades auxiliares, en ausencia o presencia de D1R y/o el péptido *loop 2* del D1R (-D1R, n=11; -D1R +*loop 2*, n=16; +D1R, n=18; +D1R +*loop 2*, n=20). ANOVA de una vía con el post-test de Dunnet (-D1R). **B.** Trazos representativos y promedios de $I_{Cav2.2}$ en células HEK293T transfectadas con Cav2.2 y sus subunidades auxiliares, en ausencia o presencia de D1R y/o el péptido *loop 1* del D1R (-D1R, n=9; -D1R +*loop 1*, n=15; +D1R, n=8; +D1R +*loop 1*, n=19). Test de Kruskal-Wallis con el post-test de Dunnet (-D1R). **C.** Trazos representativos y promedios de $I_{Cav2.2}$ en células HEK293T transfectadas con Cav2.2 y sus subunidades auxiliares, en ausencia o presencia de D1R y/o el péptido Cav2.2 C-terminal (CT) del canal (-D1R, n=18; -D1R +Cav2.2 CT, n=17; +D1R, n=21; +D1R +Cav2.2 CT, n=14). ANOVA de una vía con el post-test de Dunnet (-D1R).

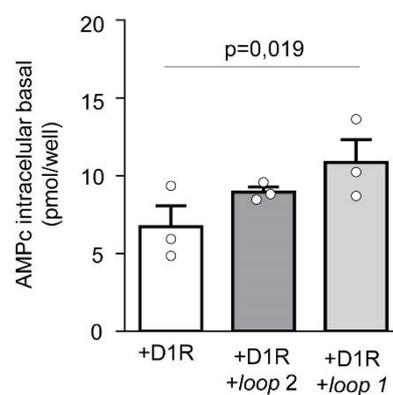


Figura 25. La coexpresión del *loop 2* o del *loop 1* del D1R no interfiere con la producción de AMPc intracelular basal mediada por el receptor. Mediciones del contenido de AMPc intracelular basal (en ausencia de dopamina) en células HEK293T transfectadas con D1R solo (+D1R, n=5), D1R con el péptido *loop 2* (+D1R+*loop 2*, n=3) o D1R con el péptido *loop 1* (+D1R+*loop 1*, n=3). Test de Kruskal-Wallis.

Hasta aquí, demostramos que la actividad constitutiva de D1R aumenta las corrientes $\text{Ca}_v2.2$ y que este efecto requiere de la interacción física entre canal y receptor. Además, logramos reproducir, en nuestro sistema experimental, el aumento basal de AMPc intracelular producto de la actividad constitutiva de D1R previamente reportado. Sin embargo, ¿es la señalización constitutiva a través de la proteína Gs necesaria para el efecto estimulador de D1R sobre los $\text{Ca}_v2.2$? Para estudiar esto, transfectamos células HEK293T con $\text{Ca}_v2.2$, sus subunidades accesorias y con o sin D1R y las preincubamos con la toxina del cólera (ChTx, del inglés *cholera toxin*, 500ng/ml), un inhibidor crónico de la proteína Gs. La preincubación con ChTx impidió el aumento de las corrientes $\text{Ca}_v2.2$ inducido por D1R, sugiriendo que el efecto depende de la activación de la proteína Gs (Figura 27). Adicionalmente, evaluamos si la vía de señalización de la proteína Gq se encuentra involucrada, ya que se ha descrito que el receptor D1R puede, en algunas circunstancias, activar esta vía intracelular (Beaulieu et al., 2015). Utilizamos un clon que codifica para un mutante dominante-negativo de la proteína G α_q (Q209L/D277N) y no observamos diferencias significativas entre la condición control y aquella con G α_q inactiva (+D1R, n=9; +D1R +G α_q Q209L/D277N, n=8; test de *t* de Student no pareado, p=0,825). Estos resultados indican que el efecto estimulador de D1R sobre $\text{Ca}_v2.2$ requiere de una proteína Gs activa, pero no involucra la vía de señalización de Gq.

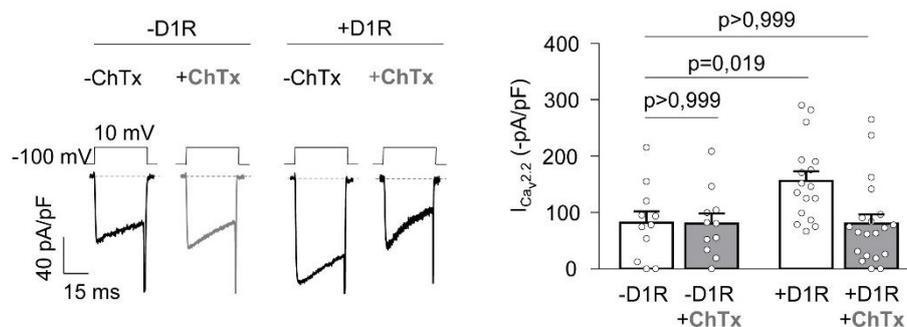


Figura 26. El efecto estimulador de D1R sobre los $\text{Ca}_v2.2$ depende de la vía de señalización de la proteína Gs. Trazos representativos y promedios de corrientes $\text{Ca}_v2.2$ ($I_{\text{Ca}_v2.2}$) en células HEK293T transfectadas con $\text{Ca}_v2.2$ y sus subunidades auxiliares, en ausencia o presencia de D1R, preincubadas o no con la toxina del cólera (ChTx, 500ng/ml) (-D1R, n=11; -D1R +ChTx, n=17; +D1R, n=20; +D1R +ChTx, n=11). ANOVA de una vía con el post-test de Dunnet (-D1R).

Uno de los mecanismos que podría explicar la mayor amplitud de corriente $\text{Ca}_v2.2$ en presencia de D1R es que la actividad constitutiva del receptor aumente la disponibilidad de canales funcionales en la membrana plasmática. De hecho, se reportó

previamente que la expresión de D1R aumenta la densidad de canales $Ca_v2.2$ en la membrana plasmática, evidenciado por técnicas de inmunocitoquímica y análisis de imágenes (Kisilevsky et al., 2008). Para evaluar esta posibilidad, expresamos en células HEK293T un clon de $Ca_v2.2$ ligado a la proteína fluorescente verde GFP (del inglés, *green fluorescent protein*), en ausencia o presencia del D1R y evaluamos la densidad de la señal GFP en la membrana plasmática. Para identificar la membrana plasmática utilizamos el marcador específico *CellMaskTM*. Al analizar las imágenes obtenidas, no encontramos diferencias significativas en el porcentaje de señal fluorescente GFP en la membrana plasmática en células transfectadas con el canal solo o en presencia de D1R (Figura 27).

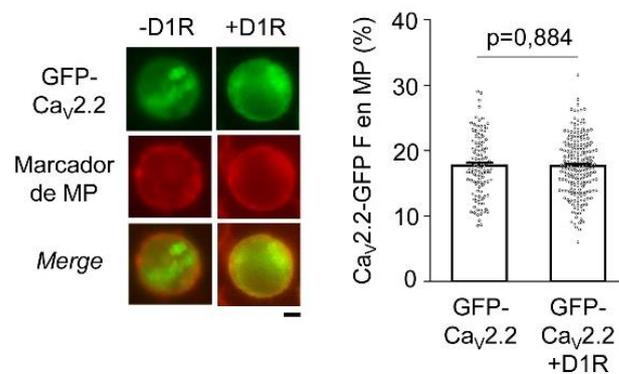


Figura 27. La expresión de D1R no modifica significativamente la señal de Ca_v -GFP en la membrana plasmática. Microfotografías representativas y promedios de porcentaje de intensidad de fluorescencia GFP (F) en la membrana plasmática (MP), en células HEK293T transfectadas con GFP- $Ca_v2.2$ y sus subunidades auxiliares, en ausencia (-D1R, n=109) o presencia de D1R (+D1R, n=198) y tratadas con el marcador de MP *CellMaskTM*. Escala 1 μ m. Test de t de Student no pareado.

A continuación, intentamos poner en evidencia el aumento de la expresión de $Ca_v2.2$ en la membrana mediante una técnica electrofisiológica. En este sentido, la magnitud de las corrientes de compuerta o *gating* está fuertemente ligada a la cantidad de canales iónicos disponibles en la membrana. Éstas son corrientes eléctricas pequeñas generadas por el movimiento de cargas positivas en el sensor de voltaje de los canales cuando se abren o se cierran. Por lo tanto, si asumimos que la corriente de *gating* de cada canal no cambia nuestras condiciones experimentales, cambios en la amplitud de la corriente macroscópica de *gating* indicarían cambios en el número funcionales insertos en la membrana celular disponibles para abrirse. Una estrategia para aislar las pequeñas corrientes de *gating* de las corrientes iónicas es llevar las células al potencial de reversión de los canales, un potencial en el cual el flujo neto de corriente macroscópica iónica es igual a cero (Castiglioni et al., 2006). Como se observa

en la Figura 28, evocamos las corrientes de *ON gating* (*gating* de apertura) llevando instantáneamente a las células desde un potencial de reposo (-100 mV) en el cual los canales están cerrados, al potencial de reversión (para el $Ca_v2.2$ cercano a +60 mV) y calculamos el movimiento de cargas como el área bajo las corrientes de *ON gating* (Q_{ON}) para cada célula, normalizado por la capacitancia de la célula. Observamos que la carga Q_{ON} fue significativamente mayor en células transfectadas con $Ca_v2.2$ y D1R en comparación con células expresando sólo $Ca_v2.2$ (Figura 28A). Asimismo, este aumento fue ocluido tanto por la sobreexpresión del *loop 2* del D1R como por la coexpresión del mutante sin actividad constitutiva D1RS199A en reemplazo del receptor salvaje. Para descartar que el aumento en la carga de *ON gating* se deba a cambios en la probabilidad de apertura relativa de los canales, graficamos la Q_{ON} en función de la amplitud máxima de la corriente de cola para cada célula (Garza-Lopez et al., 2018; Jones et al., 1999; Takahashi et al., 2004; Wei et al., 1994). Realizamos este análisis para la condición control con canal solo (-D1R) y para la condición con D1R salvaje (+D1R) y ajustamos los datos a regresiones lineales. No encontramos diferencias significativas en los parámetros de ajuste para cada *set* de datos (Figura 28B). Estos resultados indican que la actividad constitutiva de D1R aumenta las corrientes de *ON gating* de los canales $Ca_v2.2$ y que este efecto se debe a un aumento en el número de canales en la membrana y no a cambios en la probabilidad de apertura.

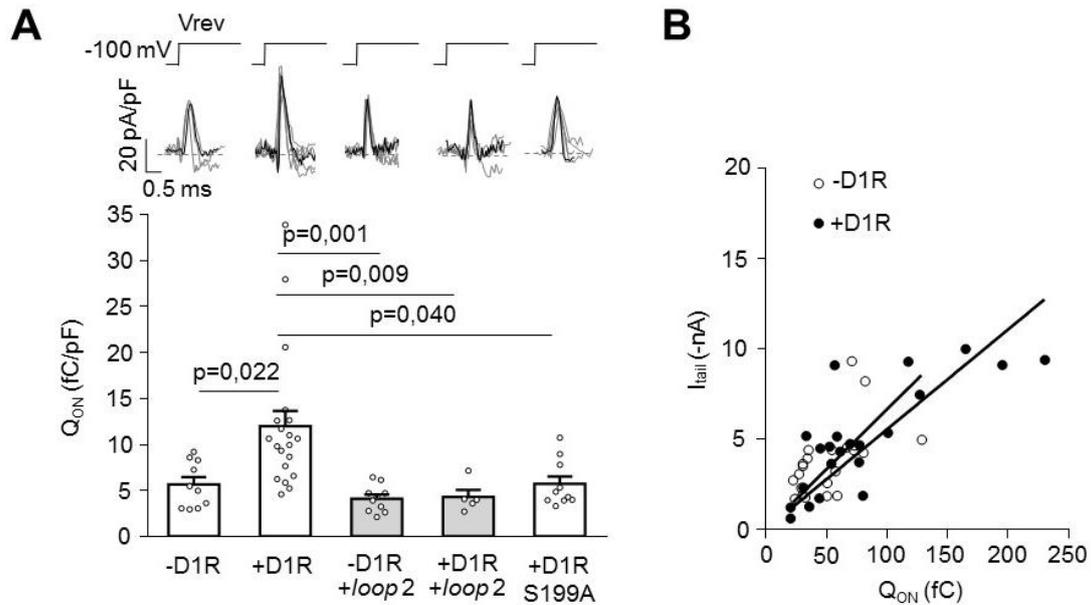


Figura 28. La actividad constitutiva de D1R aumenta las corrientes de compuerta y el número de canales Cav2.2 funcionales presentes en la membrana plasmática. **A.** Trazos (en gris) y promedios (en negro) de corrientes de gating y promedios de la carga de ON gating (Q_{ON}), normalizada por la capacitancia de la célula (pF) en células HEK293T cotransfectadas con Cav2.2 y sus subunidades auxiliares, solo o con D1R salvaje, el péptido *loop 2* del D1R y/o D1RS199A (-D1R, n=10; +D1R, n=20; -D1R +*loop 2*, n=10; +D1R +*loop 2*, n=5; +D1RS199A, n=10). ANOVA de una vía con el post-test de Tuckey (sólo se indica el valor de p para las comparaciones significativamente diferentes). **B.** Valores de Q_{ON} versus el pico de la corriente de cola Cav2.2 (I_{tail} a -60mV) en células HEK293T transfectadas con Cav2.2 y sus subunidades auxiliares, solo (-D1R, n=22) o con D1R (+D1R, n=22). Ajuste con función lineal (-D1R, $r^2=0,31$; +D1R, $r^2=0,61$). Suma de cuadrados extra, F test ($p=0,187$).

Adicionalmente, realizamos algunos experimentos para estudiar el efecto inhibitorio sobre las corrientes Cav2.2 observado ante elevados niveles de expresión de D1R observado en la figura 21. Realizamos ensayos de *patch clamp* en células transfectadas con Cav2.2 y sus subunidades accesorias en presencia o ausencia de D1R (proporción molar D1R:Cav2.2 igual a 1). Nuestros resultados indican que este efecto inhibitorio es independiente de la actividad constitutiva de D1R y de la vía de señalización de la proteína Gs, ya que no se revirtió al preincubar las células con el agonista inverso haloperidol y se mantuvo en células preincubadas con ChTx (Figura 29). Luego, nos preguntamos si el efecto inhibitorio a altas concentraciones de D1R sobre los Cav2.2 podría estar relacionado a la formación de homodímeros u oligómeros de D1R, una propiedad bien demostrada para este receptor (Casadó-Anguera et al., 2019). Esta propiedad podría modificar la vía de señalización activada por el receptor, como se ha reportado para dímeros de D1R y D2R, o bien podría interferir con la interacción física entre D1R y el Cav2.2. Para explorar esta posibilidad, transfectamos

células HEK293T con D1R en proporción molar D1R:Ca_v2.2 igual a 0,1, igual a 0,25 o con una combinación de D1R y D2R (proporción molar DR:Ca_v2.2 de 0,1 para cada uno). Observamos que el efecto estimulador de D1R a 0,1 se pierde al duplicar la cantidad de D1R o al co-transfectar bajas cantidades de D1R y D2R (Figura 30). Si bien se necesitarían experimentos adicionales para confirmar esta hipótesis, creemos que el efecto inhibitorio sobre los Ca_v2.2 podría estar relacionado con la formación de complejos entre GPCRs favorecidos por la sobre-expresión de D1R.

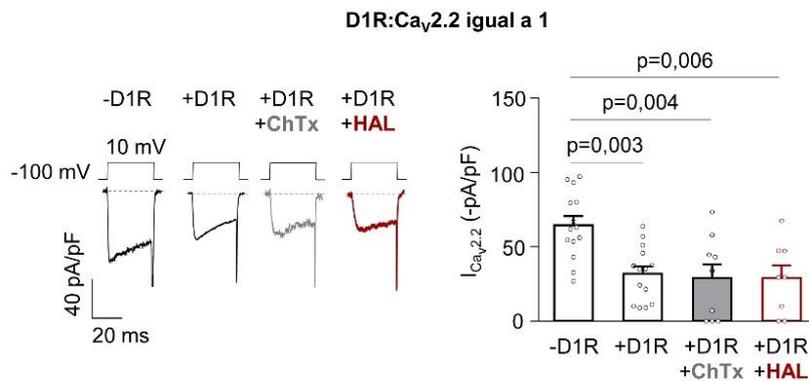


Figura 29. La disminución de las corrientes Cav2.2 en células que expresan altos niveles de D1R es independiente de la activación de la proteína Gs y es insensible a un agonista inverso de D1R. Trazos representativos y promedios de las corrientes Cav2.2 ($I_{Ca_v2.2}$) en células HEK293T transfectadas con Cav2.2 y sus subunidades auxiliares, en ausencia (-D1R, n=14) o presencia de D1R (D1R:Ca_v2.2 = 1) control (+D1R, n=14), preincubadas con la toxina del cólera (ChTx, 500 ng/ml) (+D1R+ChTx, n=9) o preincubadas con haloperidol (HAL, 1 μ M) (+D1R+HAL, n=8). ANOVA de una vía con el post-test de Tuckey (sólo se muestran las comparaciones estadísticamente significativas).

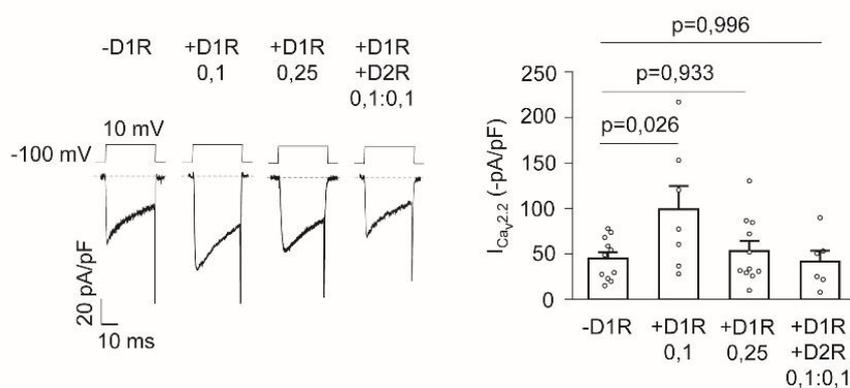


Figura 30. La coexpresión de D1R y D2R impide el aumento de las corrientes Cav2.2 mediado por la actividad constitutiva de D1R. Trazos representativos y promedios de las corrientes Cav2.2 ($I_{Ca_v2.2}$) en células HEK293T transfectadas con Cav2.2 y sus subunidades auxiliares, en ausencia de D1R (-D1R, n=11), en presencia de bajos niveles de D1R (D1R:Ca_v2.2 = 0,1; n=7), en presencia de niveles intermedios de D1R (D1R:Ca_v2.2 = 0,25; n=11) o en presencia de D1R y D2R (proporción molar D1R:D2R:Ca_v2.2 = 0,1:0,1; n=6). ANOVA de una vía con el post-test de Dunnet (-D1R).

En resumen, encontramos que la coexpresión de D1R tiene un efecto dual sobre las corrientes $Ca_v2.2$ en un sistema de expresión heteróloga. Por un lado, la actividad constitutiva de D1R aumenta la amplitud de las corrientes $Ca_v2.2$ como consecuencia de una mayor densidad de canales funcionales presentes en la membrana celular, y este efecto dependería tanto de una interacción física entre el loop 2 del D1R y la región C-terminal de $Ca_v2.2$, así como de la presencia de la proteína Gs activa en forma crónica. Por otro lado, el efecto inhibitorio de las $Ca_v2.2$ en células que expresan elevadas concentraciones de D1R no se debe a su actividad constitutiva y planteamos la posibilidad de que esté relacionado a la formación de dímeros entre receptores D1R.

Resultados

Capítulo 3: Estudio del impacto funcional de la actividad evocada por agonista y la actividad constitutiva de los receptores tipo-D1R en neuronas piramidales de la CPFm.

En este capítulo describimos los resultados correspondientes al cuarto objetivo planteado para esta tesis doctoral. Realizamos distintos experimentos en rebanadas *ex vivo* y en un sistema de expresión heterólogo para estudiar el *cross-talk* entre la actividad constitutiva y la actividad evocada de D1R. Exploramos el efecto de clorpromazina sobre la respuesta postsináptica basal, evocada por estímulos eléctricos y estimulada por SKF38393, un agonista específico de los receptores tipo-D1R. Para ello, analizamos el efecto de los ligandos de D1R clorpromazina y SKF38393 sobre las corrientes postsinápticas excitatorias e inhibitorias y sobre la actividad transcripcional en neuronas piramidales de la CPFm.

Objetivo 4. Estudiar el impacto de la actividad constitutiva de los receptores tipo-D1R sobre el efecto funcional de su actividad evocada por agonista en las neuronas piramidales de la CPFm.

En este último capítulo, exploramos los posibles impactos del efecto estimulador de la actividad constitutiva de los receptores tipo-D1R sobre los $Ca_v2.2$ en la funcionalidad de las neuronas de la CPFm. Como mostramos en la figura 15, la actividad evocada por agonista de D1R modula negativamente a los $Ca_v2.2$ por lo que existe una dualidad en la modulación de estos canales por los dos modos de actividad de D1R. Esta dualidad entre actividad constitutiva y evocada podría cobrar relevancia en un contexto fisiológico como la CPFm de ratón, donde los niveles de dopamina y los niveles de expresión de D1R fluctúan en el tiempo dependiendo de la actividad física, el grado de estimulación cognitiva, la edad del animal, etc. Además, en situaciones patológicas estas oscilaciones están frecuentemente acompañadas de la presencia crónica de antipsicóticos. Entonces, ¿cómo se integran estos dos efectos marcadamente distintos en la farmacología de D1R, mecanismo y temporalidad? Aquí, realizamos una serie de experimentos para intentar comprender la relación entre los efectos constitutivos estimuladores y los efectos evocados inhibitorios de los receptores tipo-D1R sobre las corrientes $Ca_v2.2$ en un sistema de expresión heteróloga y en rebanadas *ex vivo* de ratón. Además, evaluamos su impacto sobre algunas funciones neuronales en la CPFm.

Primero, quisimos caracterizar en nuestro sistema experimental la actividad de D1R evocada por dopamina. Mediante mediciones de AMPc intracelular por FRET analizamos el aumento de AMPc en respuesta a concentraciones crecientes de dopamina y construimos la curva de dosis-respuesta. Como es esperable para un receptor acoplado a Gs, la aplicación de dopamina generó un aumento en el contenido de AMPc intracelular en forma dosis-dependiente (Figura 31). Además, registramos las corrientes $Ca_v2.2$ antes y después de la aplicación aguda de dopamina en células HEK293T transfectadas con $Ca_v2.2$, sus subunidades accesorias y D1R, preincubadas o no con ChTx (inhibidor crónico de la proteína Gs). Observamos que la aplicación de dopamina generó la inhibición rápida de las corrientes $Ca_v2.2$ y que este efecto es ocluido por ChTx (Figura 32). Con estos resultados logramos reproducir en nuestro sistema experimental algunos aspectos de la actividad evocada de D1R previamente reportados en la bibliografía.

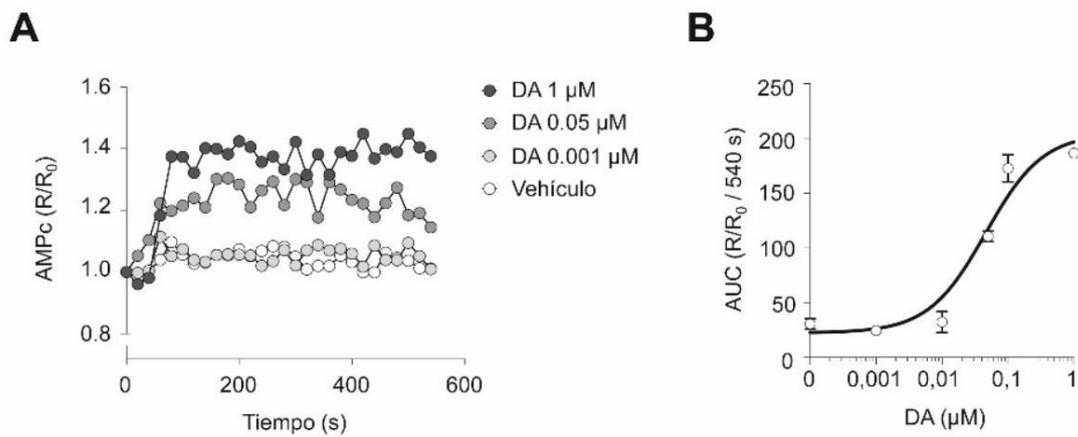


Figura 31. Dopamina induce el aumento del AMPc intracelular mediado por D1R en forma dosis-dependiente. Cursos temporales representativos del aumento de AMPc intracelular registrado mediante FRET en tiempo real en células HEK293T transfectadas con D1R (+D1R) luego de la aplicación aguda de concentraciones crecientes de dopamina (DA 0,001, 0,05 o 1 μM) o DMEM (vehículo). **B.** Curva de dosis-respuesta a dopamina (DA) construida en base a los valores de AUC (del inglés *Area Under Curve*), que representan el área bajo la curva acumulada a 540 segundos para cada concentración de DA aplicada ($n=3$ para cada concentración). Ajuste con ecuación de Hill: $\text{EC}_{50}=0,044 \mu\text{M}$; $r^2=0,93$.

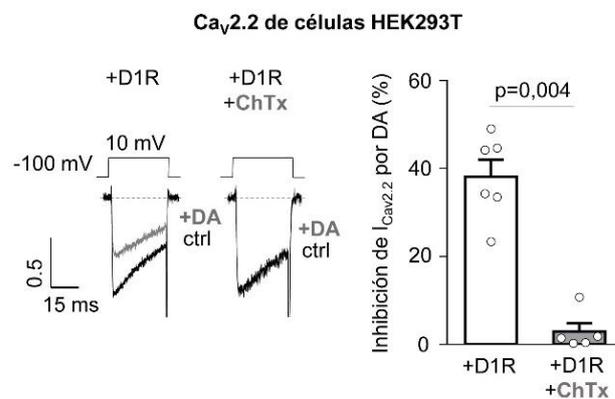


Figura 32. La inhibición de los Cav2.2 por la actividad evocada por dopamina del D1R es ocluida por un inhibidor de la proteína Gs. Trazos representativos y promedios de los porcentajes de inhibición de las corrientes Cav2.2 ($I_{\text{Cav}2.2}$) luego de la aplicación aguda de dopamina (DA, 10 μM) en células HEK293T transfectadas con Cav2.2, sus subunidades accesorias y D1R, control o preincubadas con la toxina del cólera (ChTx, 500 ng/ml) (+D1R, $n=6$; +D1R +ChTx, $n=5$). Las corrientes se encuentran normalizadas a la amplitud máxima de corriente control. Test de Mann-Whitney.

A continuación, estudiamos si el grado de actividad constitutiva de D1R afecta su actividad evocada por dopamina en neuronas piramidales de la CPFm. En primer lugar, evaluamos la sensibilidad de las corrientes nativas Ca_v a ligandos de los distintos receptores de dopamina en neuronas provenientes de animales control (Figura 33).

Registramos las corrientes Ca_v HVA evocadas a altos voltajes antes y después de la aplicación de dopamina, el agonista endógeno de todos los receptores de dopamina, y encontramos que produce aproximadamente un 20 % de inhibición de las corrientes de manera aguda. Al evaluar la sensibilidad de las mismas corrientes al agonista selectivo para los receptores tipo-D1R, SKF38393, observamos un efecto similar al producido por dopamina, mientras que quinpirole, un agonista selectivo de los receptores tipo-D2R, no tuvo efecto (test de t de una muestra *versus* cero, $p=0,13$). Adicionalmente, evaluamos el efecto de dopamina luego de la aplicación previa de quinpirole (agonista de D2R) o clorpromazina (antagonista de D2R) y observamos nuevamente un porcentaje de inhibición de ~20 %. Estos resultados indican que las corrientes Ca_v HVA en neuronas piramidales de la CPFm son sensibles a la actividad evocada de los receptores tipo-D1R, pero no a la activación de los receptores de tipo-D2R.

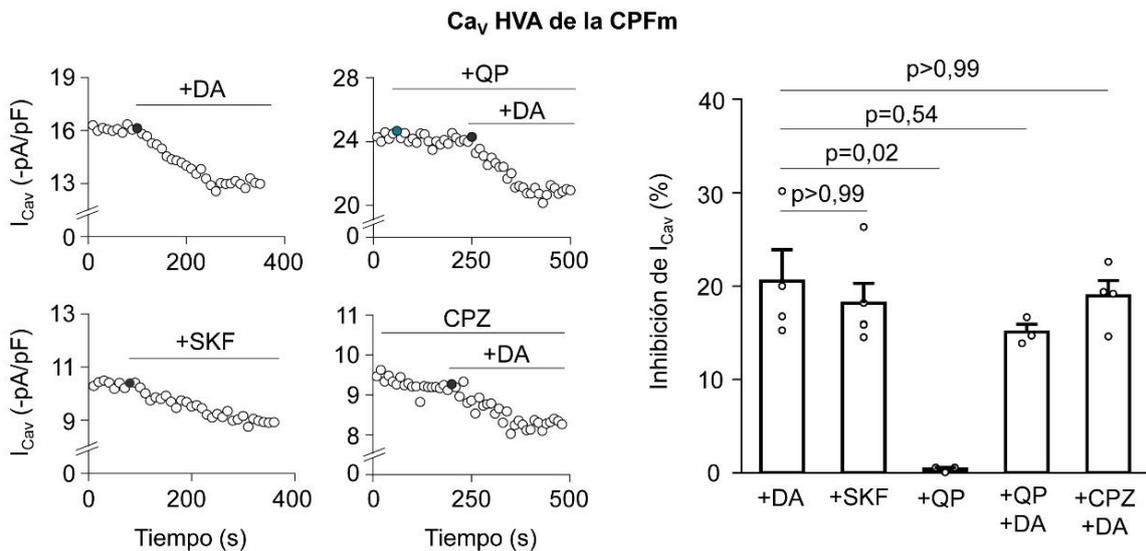


Figura 33. Las corrientes Ca_v HVA nativas son sensibles a la actividad evocada de los receptores tipo-D1R. Cursos temporales representativos y promedios de los porcentajes de inhibición de las corrientes nativas Ca_v (I_{Cav}) evocadas a altos voltajes (0 mV, Ca_v HVA) luego de la aplicación aguda de: dopamina (+DA, 1 μ M, $n=4$), SKF38393 (+SKF, 1 μ M, $n=5$), quinpirol (+QP, 40 μ M, $n=3$), dopamina en presencia de quinpirol (+QP +DA, $n=3$) y dopamina en presencia de clorpromazina (CPZ, 1 μ M) (+CPZ +DA, $n=4$), en neuronas piramidales de la capa 5/6 de la CPFm provenientes de ratones control. Los puntos coloreados en los cursos temporales indican el momento de aplicación de las drogas. Test de Kruskal-Wallis con el post-test de Dunnet (+DA).

Siendo que nosotros proponemos que la actividad constitutiva de D1R aumenta la densidad de $Ca_v2.2$ disponible en la membrana de las neuronas piramidales de la CPFm, a continuación, estudiamos si existe un cambio en la sensibilidad de estos canales a los agonistas D1R en estas células. Nuevamente, registramos corrientes de calcio Ca_v HVA en neuronas piramidales de la CPFm provenientes de ratones tratados IP con vehículo o clorpromazina, aplicamos el SKF38393 y analizamos el porcentaje de inhibición de las corrientes (Figura 34). En efecto, observamos que, en animales tratados con clorpromazina, la sensibilidad de las corrientes Ca_v al agonista de receptores tipo-D1R fue significativamente menor que en animales control.

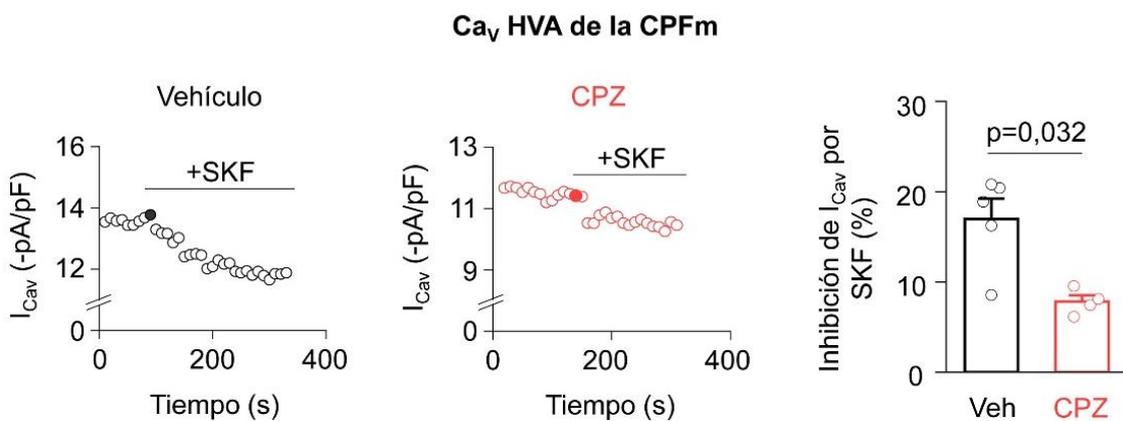


Figura 34. Clorpromazina IP reduce la sensibilidad de las corrientes Ca_v HVA nativas a la actividad evocada de los receptores tipo-D1R. Cursos temporales y promedios de los porcentajes de inhibición de las corrientes nativas Ca_v (I_{Cav}) evocadas a altos voltajes (0 mV, Ca_v HVA) luego de la aplicación aguda de SKF38393 (+SKF, 10 μ M), registradas en neuronas piramidales de la capa 5/6 de rebanadas de CPFm provenientes de ratones tratados con NaCl 0,9% (vehículo) o clorpromazina (CPZ, 1mg/kg). Los puntos coloreados en los cursos temporales indican el momento de aplicación de las drogas. Test de Mann-Whitney.

Para complementar estas últimas observaciones, con un sistema *in vitro* más controlado, evaluamos si el efecto de dopamina se ve modificado al modular la actividad constitutiva de D1R, mediante la presencia de las mutaciones de D1R que reducen la actividad constitutiva y la sobreexpresión de los péptidos cortos que interfieren con la interacción física entre el receptor y el $Ca_v2.2$. Registramos el aumento de AMPc intracelular evocado por dopamina por la técnica FRET en tiempo real en células HEK293T transfectadas con D1R salvaje, D1RS199A o D1R salvaje en presencia del *loop 2* o el *loop 1* y no encontramos diferencias entre estas condiciones (Figura 35). Esto nos indica que en estas condiciones el receptor es funcional y puede unirse a

ligando sin dificultades. A continuación, evaluamos el efecto de una dosis saturante de dopamina sobre las corrientes $Ca_v2.2$ en células HEK293T transfectadas sólo con D1R salvaje, los mutantes de D1R (D1RS199A y D1RSTI) o el D1R salvaje con sobreexpresión de los péptidos *loop 1*, *loop 2* o C-terminal del $Ca_v2.2$, y no encontramos diferencias significativas entre estas condiciones experimentales (Figura 36). En contraste con lo observado en rebanadas de la CPFm, no encontramos diferencias a dosis saturantes de dopamina en condiciones experimentales en las que redujimos la actividad constitutiva de D1R en células HEK293T. En base a estas observaciones y los resultados mostrados en la figura 9, pensamos que el efecto de la actividad constitutiva de D1R sobre los $Ca_v2.2$ parece tener un impacto más dramático en neuronas con niveles de expresión endógenos, en comparación con células HEK293T manipuladas para expresar estas proteínas en exceso.

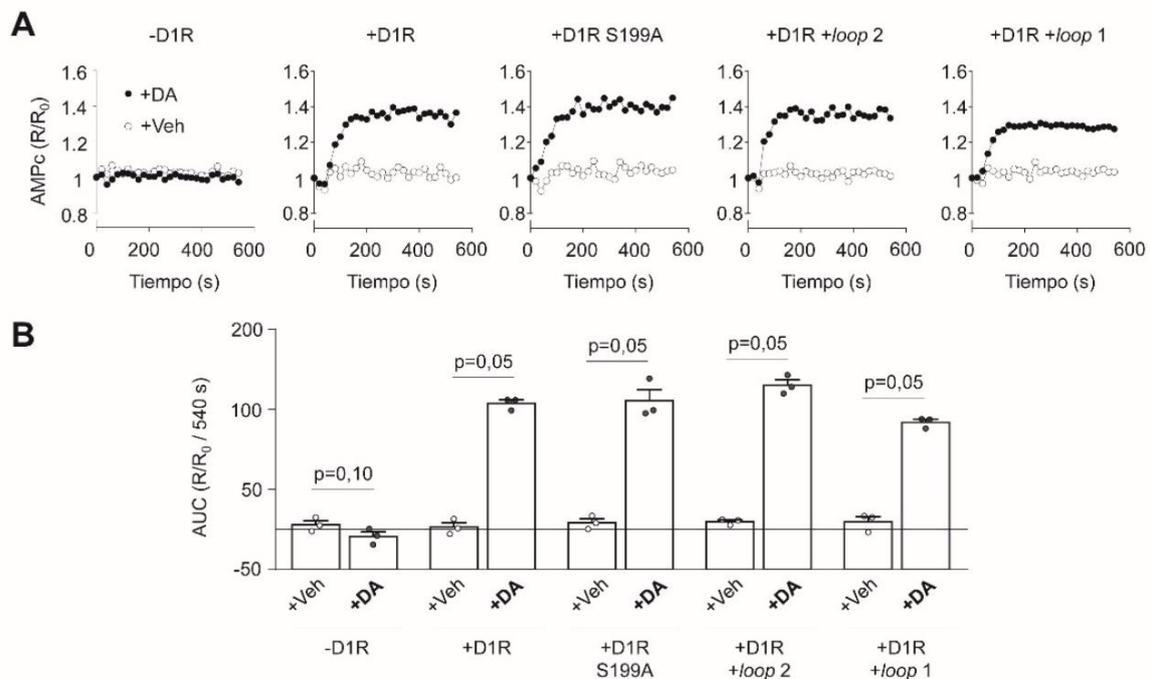


Figura 35. La expresión del mutante D1RS199A o de los péptidos cortos del D1R no altera la producción de AMPc inducida por dopamina. A. Cursos temporales representativos del aumento de AMPc intracelular registrado mediante FRET en tiempo real luego de la aplicación aguda de vehículo (+Veh, DMEM) o dopamina (+DA, 1 μ M), en células HEK293T transfectadas con plásmido vacío (-D1R), D1R salvaje (+D1R), D1RS199A (+D1RS199A), D1R salvaje y el péptido *loop 2* de D1R (+D1R +*loop 2*) o D1R salvaje y el péptido *loop 1* de D1R (+D1R +*loop 1*). **B.** AUC (del inglés *Area Under Curve*) representa el área bajo la curva acumulada a 540 segundos para cada condición (n=3 para cada condición). Test de Mann-Whitney.

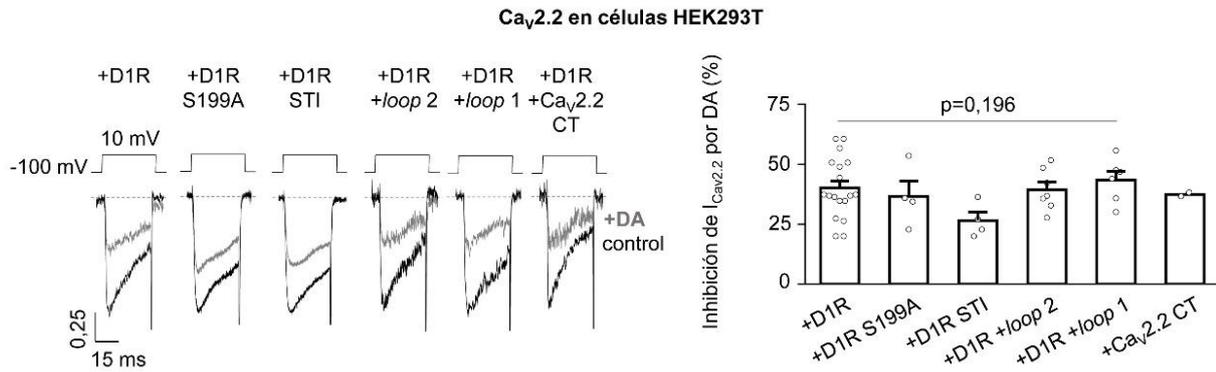


Figura 36. La expresión del mutante D1RS199A o de los péptidos cortos del D1R no altera la inhibición de las corrientes Cav2.2 inducida por dopamina. Trazos representativos y promedios de los porcentajes de inhibición de las corrientes Cav2.2 ($I_{Cav2.2}$) luego de la aplicación aguda de dopamina (DA, 10 μ M) en células HEK293T transfectadas con Cav2.2, sus subunidades auxiliares y el D1R salvaje (+D1R, n=18), el D1RS199A (+D1RS199A, n=4), el D1RSTI (+D1RSTI, n=4), el D1R salvaje y el *loop 2* (+D1R +*loop 2*, n=7), el D1R salvaje y el *loop 1* (+D1R +*loop 1*, n=6) o el D1R salvaje y el péptido C-terminal del Cav2.2 (+D1R +Cav2.2 CT, n=2). Las corrientes se encuentran normalizadas a la amplitud máxima de corriente control. Test de Kruskal-Wallis con el post-test de Dunnet (+D1R).

A continuación, exploramos si los diferentes niveles de expresión de D1R en células HEK293T modifican el efecto de dopamina sobre los Ca_v2.2. Analizamos la inhibición aguda de las corrientes Ca_v2.2 evocada por concentraciones crecientes de dopamina en tres condiciones con distintas cantidades transfectadas de D1R (en la proporción molar de D1R:Ca_v2.2 igual a 0,05, 0,1 y 1) y construimos las curvas de dosis-respuesta correspondientes (Figura 37). Observamos que la sensibilidad a dopamina fue mayor en células transfectadas con una elevada cantidad de D1R (1) en comparación con las condiciones con bajas cantidades de D1R (0,05 y 0,1), a las cuales su coexpresión estimula la corriente basalmente, mientras que el porcentaje de inhibición máximo se mantuvo igual en todas las condiciones experimentales. Así, a concentraciones bajas de D1R (0,1), donde el efecto estimulador de la actividad constitutiva es máximo, y a una concentración de D1R menor (0,05) no encontramos diferencias en la sensibilidad a dopamina. Sin embargo, a concentraciones altas de D1R (1), donde se evidencia una reducción de la corriente Ca_v2.2 basal, observamos un aumento en la sensibilidad a dopamina. Se requerirían experimentos adicionales para comprender en profundidad estos resultados.

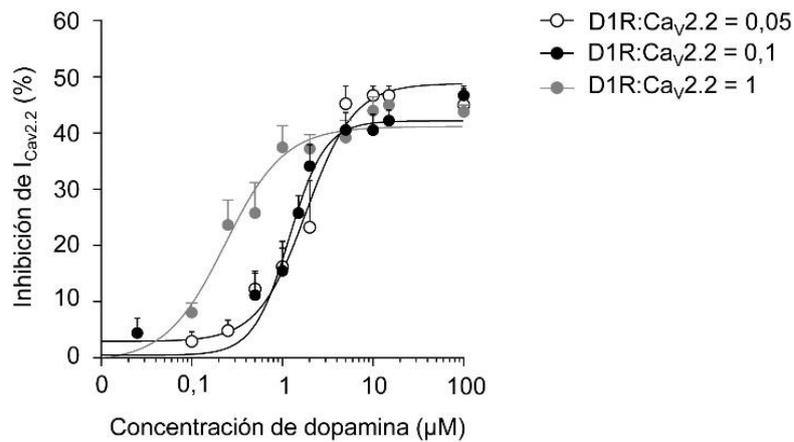


Figura 37. Las corrientes Ca_v2.2 en células que expresan altos niveles de D1R presentan una mayor sensibilidad a dopamina, en comparación con bajos niveles de expresión de D1R. Curvas de dosis-respuesta a dopamina en células HEK293T transfectadas con Ca_v2.2, sus subunidades auxiliares y D1R (D1R:Ca_v2.2 igual a 0,05, a 0,1 o a 1). Ajustes mediante ecuaciones de Hill. D1R:Ca_v2.2 = 0,05: inhibición máx.=48,79 %, EC₅₀=1,82 μM , $r^2=0.79$, $n=7$. D1R:Ca_v2.2 = 0,01: inhibición máx.=42,15 %, EC₅₀=1,19 μM , $r^2=0.86$, $n=17$. D1R:Ca_v2.2 = 1: inhibición máx.=41,14 %, EC₅₀=0,23 μM , $r^2=0.70$, $n=7$. Suma de Cuadrados Extra, F test ($p<0,0001$).

En el transcurso de este trabajo observamos que la administración *in vivo* de clorpromazina reduce significativamente las corrientes Ca_v HVA nativas y describimos que este efecto se debe específicamente a la reducción de las corrientes Ca_v2.2, en un mecanismo dependiente de la actividad de D1R, y de las corrientes Ca_v1, sensibles a un efecto directo de clorpromazina. En este punto, quisimos estudiar el efecto de clorpromazina sobre la respuesta postsináptica excitatoria de las neuronas piramidales, como una posible consecuencia de la modulación de la entrada de calcio actividad-dependiente mediada por los Ca_v1 y Ca_v2.2 postsinápticos. Empleamos nuevamente nuestro protocolo de inyecciones IP en ratones, en donde tratamos a los mismos con vehículo o clorpromazina. Registramos las corrientes postsinápticas evocadas y miniatura y evaluamos cambios en actividad transcripcional en neuronas de la CPFm.

En primer lugar, registramos las corrientes postsinápticas evocadas eléctricamente utilizando un electrodo de estimulación unipolar ubicado en la capa 2/3, donde se encuentran las aferencias sinápticas (Figura 38) y registramos las corrientes postsinápticas excitatorias (EPSC) manteniendo las células a un potencial de -70 mV. Encontramos que la amplitud de las EPSC fue significativamente menor en neuronas provenientes de animales tratados IP con clorpromazina en comparación con los

tratados con vehículo (Figura 39). Adicionalmente, aplicamos el agonista SKF38393 sobre las EPSC y vimos un aumento significativo tanto en neuronas provenientes de animales control como tratados con clorpromazina. La facilitación de las EPSC por agonistas de los receptores tipo-D1R fue reportado anteriormente para la CPF, la corteza entorrinal y el cuerpo estriado (Glovaci et al., 2014; Gonzalez-Islas & Hablitz, 2003; Umemiya & Raymond, 1997). Además, registramos las corrientes postsinápticas excitatorias miniatura (mEPSC), aplicando TTX ($1\mu\text{M}$) a la solución externa y manteniendo a las neuronas a -70 mV en ausencia de estímulos eléctricos, y encontramos que el tratamiento con clorpromazina redujo significativamente la amplitud y la frecuencia promedio de las mEPSC en comparación con el control tratado con vehículo (Figura 40). Estos resultados indican que clorpromazina reduce la actividad sináptica excitatoria, debido a posibles efectos a nivel presináptico y postsináptico, sin afectar el efecto de SKF sobre las EPSCs. Entre estos, el efecto de clorpromazina a nivel postsináptico podría estar relacionado a la disminución de las corrientes Ca_v1 y $\text{Ca}_v2.2$ somáticas descrito en el capítulo 1.

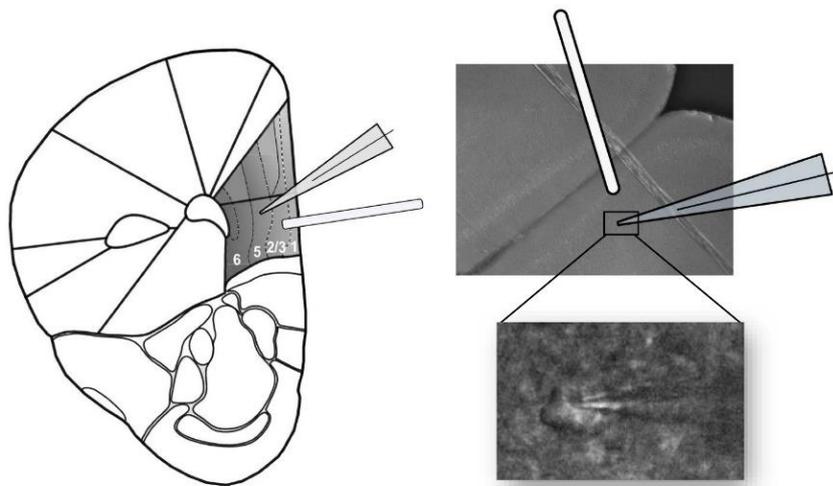


Figura 38. Registro de corrientes postsinápticas evocadas en neuronas piramidales de la capa 5/6 de la CPFm. *Izquierda:* esquema de un hemisferio de rebanada coronal de cerebro de ratón, con una pipeta que contiene el electrodo de registro ubicada en la capa 5/6 de la CPFm (indicada en gris oscuro) y un electrodo unipolar de estimulación ubicado en la capa 2/3. *Derecha:* fotografía de una rebanada coronal de ratón que contiene la CPFm, iluminada con una lámpara infrarroja. Se indica la ubicación del electrodo unipolar de estimulación en las capas superficiales (2/3) y la micropipeta de *patch* con el electrodo de registro en las capas profundas (5/6). El recuadro muestra una fotografía del tejido de la CPFm en mayor aumento e iluminado con una lámpara infrarroja, mostrando una micropipeta de registro haciendo contacto con una neurona piramidal de la capa 5/6.

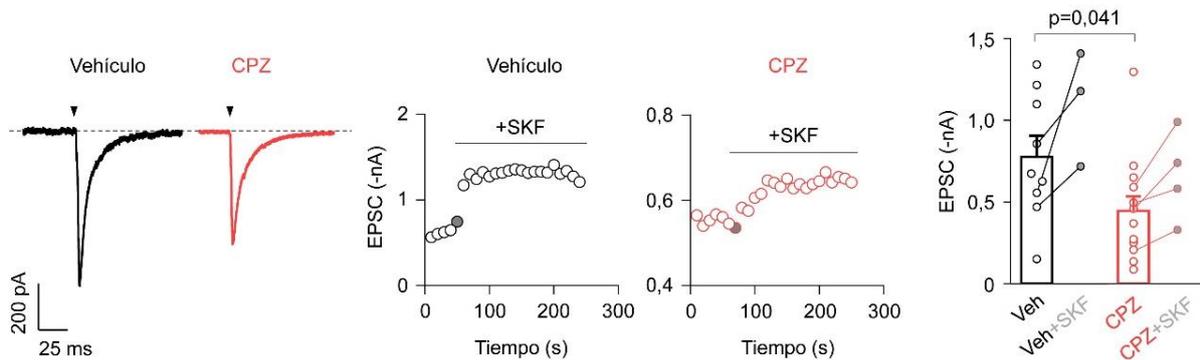


Figura 39. Clorpromazina IP reduce la amplitud de las EPSC, mientras que SKF38393 las facilita.

Izquierda: trazos representativos de las corrientes postsinápticas excitatorias (EPSC) registradas en neuronas piramidales de la capa 5/6 de la CPFm provenientes de ratones tratados con vehículo (Veh, NaCl 0.9%) o clorpromazina (CPZ, 1 mg/kg). Centro: cursos temporales representativos de las EPSC luego de la aplicación aguda de SKF38393 (+SKF, 1 μ M) en neuronas piramidales de la capa 5/6 de la CPFm provenientes de ratones tratados con vehículo o CPZ. Los puntos coloreados indican el momento de aplicación de SKF. Derecha: promedios de las EPSC en neuronas piramidales de la capa 5/6 de la CPFm (Veh, n=8) (Veh +SKF, n=3) (CPZ, n=10) (CPZ +SKF n=4). Test de t de Student no pareado.

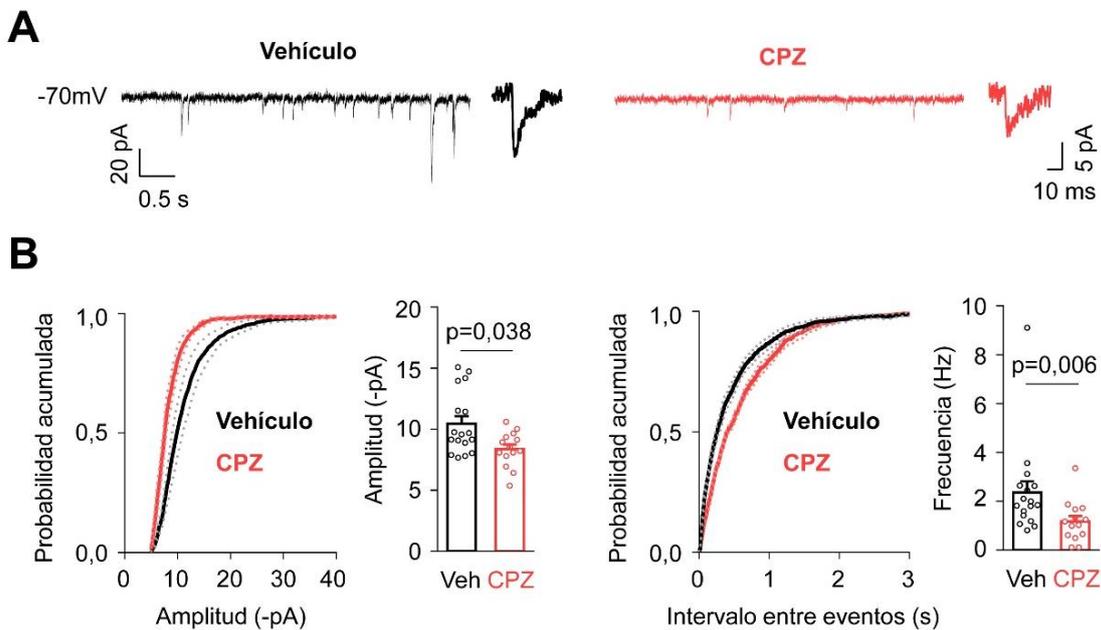


Figura 40. Clorpromazina IP reduce la amplitud y frecuencia de mEPSC en neuronas de la CPFm. A.

Trazos representativos de las corrientes postsinápticas excitatorias miniatura (mEPSC) registradas en neuronas piramidales de la capa 5/6, en rebanadas de cerebro de ratones tratados con NaCl 0,9% (Veh) o clorpromazina (CPZ, 1 mg/kg). **B. Izquierda:** probabilidad acumulada y promedios de la amplitud de los mEPSC (Veh, n=17) (CPZ, n=14). Test de Mann-Whitney. **Derecha:** probabilidad acumulada del intervalo entre eventos y promedios de las frecuencias de los mEPSC (Veh, n=17) (CPZ, n=14). Test de Mann-Whitney.

En estos experimentos en los que utilizamos la solución externa aCSF y una solución interna en base a Cs-metanosulfonato baja en cloruro, es posible registrar corrientes postsinápticas inhibitorias evocadas (IPSC) y miniatura (mIPSC) en las mismas neuronas en las que registramos las corrientes excitatorias. Realizamos estos registros manteniendo a las células a un potencial constante de 0 mV, en donde la fuerza impulsora de las EPSC es despreciable y las IPSC se evidencian como corrientes positivas (aniónicas entrantes). Observamos una tendencia a que el tratamiento IP con clorpromazina aumente la amplitud de las IPSC en comparación con los animales tratados con vehículo (Figura 41). Además, clorpromazina no modificó significativamente ni la amplitud ni la frecuencia de los mIPSC (Figura 42). Esta forma de aislar las corrientes excitatorias de las inhibitorias sin aplicar drogas inhibitorias específicas de los receptores involucrados nos permitió registrar EPSC e IPSC en la misma neurona y así poder calcular el balance de excitación *versus* inhibición para cada célula (balance E/I). Encontramos que el balance E/I para la actividad postsináptica evocada se vio significativamente alterado en animales tratados con clorpromazina, tendiendo hacia un estado menos excitable (Figura 43A), mientras que no observamos cambios significativos en el balance E/I para la actividad sináptica miniatura (Figura 43B). Estos resultados indican que clorpromazina modifica tanto las corrientes postsinápticas excitatorias como las inhibitorias, generando globalmente un desbalance E/I en las neuronas piramidales presentes en la capa 5/6 de la CPFm de ratón. Restan más experimentos para comprender cuáles de estos efectos podrían deberse a la estimulación de las corrientes $Ca_v2.2$ por la actividad constitutiva de D1R.

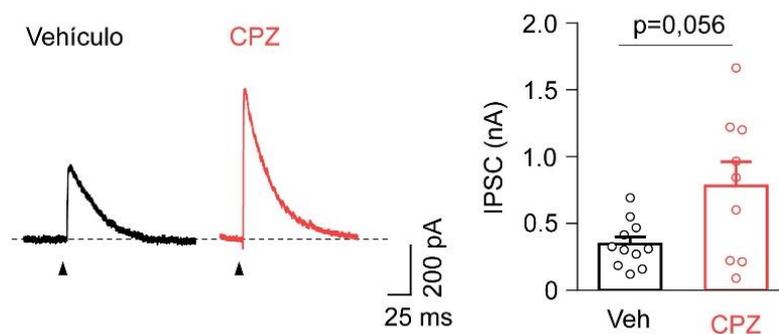


Figura 41. Clorpromazina IP aumenta la amplitud de las IPSC en neuronas piramidales de la CPFm. Trazos representativos y promedios de las corrientes postsinápticas inhibitorias (IPSC) registradas en neuronas piramidales de la capa 5/6, en rebanadas de CPFm provenientes de ratones tratados con NaCl 0,9% (Veh, n=11) o clorpromazina (CPZ, 1 mg/kg, n=9). Test de Mann-Whitney.

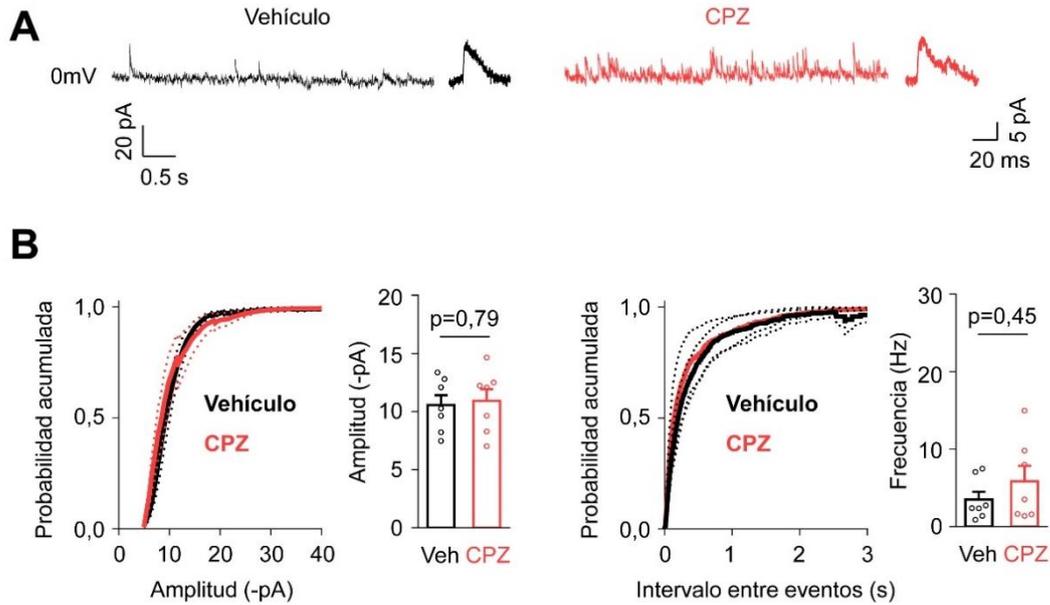


Figura 42. Clorpromazina IP no modifica significativamente la amplitud o frecuencia de las mIPSC en neuronas piramidales de la CPFm. **A.** Trazos representativos de las corrientes postsinápticas inhibitorias miniatura (mIPSC) registradas en neuronas piramidales de la capa 5/6, en rebanadas de cerebro de ratones tratados con NaCl 0,9% (Veh) o clorpromazina (CPZ, 1 mg/kg). **B.** Izquierda: probabilidad acumulada y promedio de la amplitud de los mIPSC (Veh, n=7) (CPZ, n=7). Test de t de Student no pareado. Derecha: probabilidad acumulada del intervalo entre eventos y promedios de las frecuencias de los mIPSC (Veh, n=7) (CPZ, n=7). Test de Mann-Whitney.

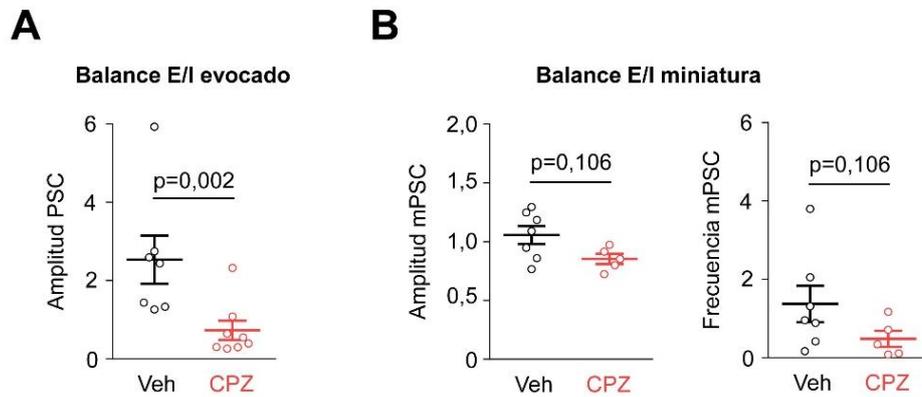


Figura 43. Clorpromazina IP altera el balance E/I evocado en neuronas piramidales de la CPFm. **A.** Promedios de los balances de excitación e inhibición (Balance E/I evocado) calculados para cada célula como la relación entre la amplitud de EPSC y la amplitud de IPSC registrados en neuronas provenientes de animales tratados con NaCl 0,9% (Veh, n=7) o clorpromazina (CPZ, 1mg/kg, n=8) (mostrados en Figuras 39 y 41). Test de Mann-Whitney. **B.** Promedios de los balances de excitación e inhibición (Balance E/I miniatura) calculados para cada célula como la relación entre la amplitud o la frecuencia de los mEPSC y los mIPSC registrados en neuronas provenientes de animales tratados con Veh (n=7) o CPZ (n=5) (mostrados en Figuras 40 y 42). Test de Mann-Whitney.

Finalmente, quisimos evaluar si el agonista inverso tipo-D1R, clorpromazina, es capaz de modular la estimulación de c-Fos inducida por el agonista tipo-D1R, SKF38393, en la CPFm. Exploramos el efecto de estos ligandos de los receptores tipo-D1R sobre los niveles de actividad transcripcional en neuronas piramidales de la CPFm. Trabajos previos reportaron que el SKF38393 y otros agonistas específicos tipo-D1R generan una activación del factor de transcripción c-Fos en áreas corticales y subcorticales del cerebro de roedores (Chocyk et al., 2008; Diaz Heijtze et al., 2004). Para ello, utilizamos ratones salvajes y los pretratamos con una única inyección IP de clorpromazina (1 mg/kg) o vehículo (NaCl 0,9%) 24 h antes del sacrificio, en combinación con SKF38393 (3 mg/kg) o vehículo (NaCl 0,9%) 2 h antes del sacrificio. Realizamos las inmunohistoquímicas contra c-Fos en la CPFm (Figura 44A) y encontramos que el tratamiento con SKF38393 indujo un aumento significativo del número de células c-Fos-positivas de ~63% (Figura 44B). Si bien observamos una tendencia a que el pretratamiento con clorpromazina prevenga el aumento de reactividad a c-Fos inducido por SKF38393, este efecto no resultó estadísticamente significativo (Figura 44B).

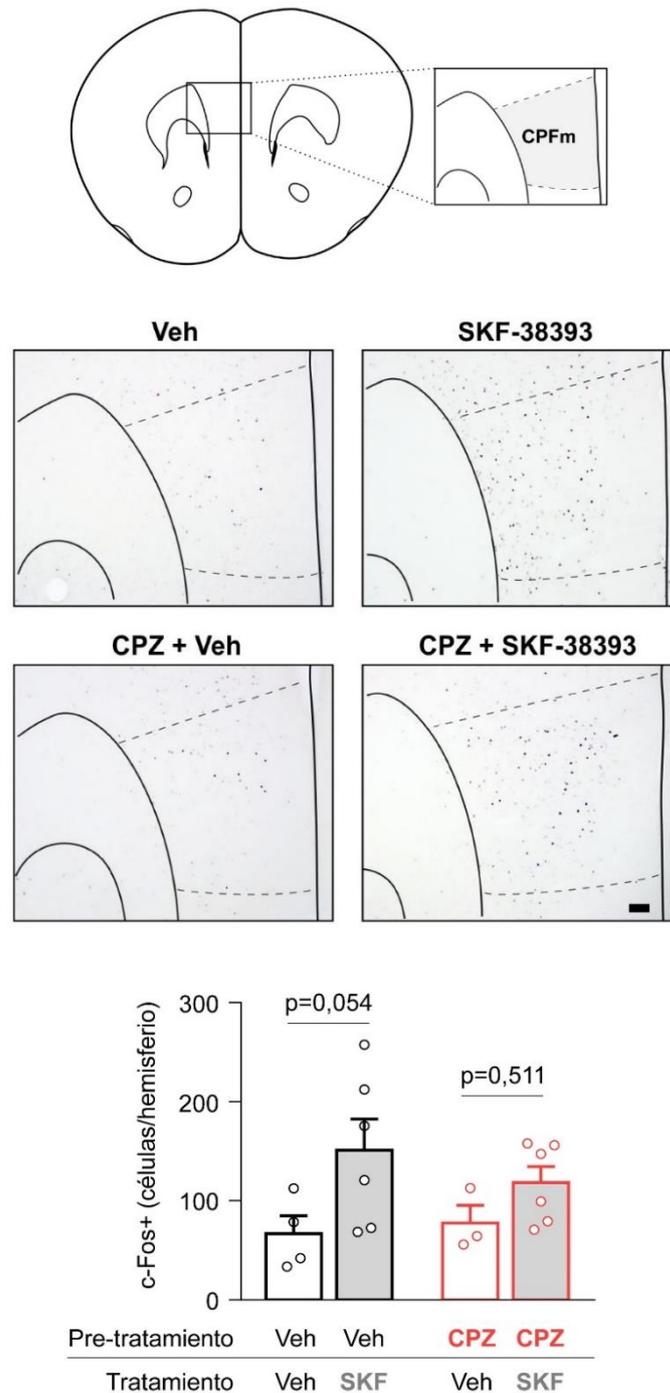


Figura 44. El agonista de los receptores tipo-D1R, SKF38393, induce un aumento en el número de células c-Fos positivas en la CPFm. *Panel superior:* representación esquemática de una sección coronal de cerebro de ratón (Bregma +1,70 mm), indicando la ubicación de la CPFm (recuadro). *Panel medio:* microfotografías representativas de cortes coronales de cerebros sometidos a una inmuno-tinción simple contra c-Fos, provenientes de ratones tratados con: vehículo (NaCl 0,9 %), clorpromazina (CPZ, 1 mg/kg) y/o SKF38393 (SKF, 3 mg/kg) mediante inyecciones IP 24 h (pre-tratamiento) o 2 h (tratamiento) antes del sacrificio. Escala: 100 μ m. **B.** Análisis cuantitativo del número de neuronas c-Fos+ por hemisferio en las condiciones experimentales planteadas. ANOVA a dos vías con post-test de Sidak. Interacción: $p=0,41$. Pre-tratamiento: $p=0,67$. Tratamiento: $p=0,028$.

En resumen, en este capítulo mostramos que la actividad evocada y constitutiva de D1R presentan efectos opuestos sobre las corrientes $Ca_v2.2$. Encontramos que modular la actividad constitutiva de los receptores tipo-D1R in vivo redujo la sensibilidad de las corrientes Ca_v HVA nativas al agonista específico SKF38393, sugiriendo que el grado de actividad constitutiva de estos receptores influye sobre los efectos de su actividad evocada, aunque no logramos observar estas diferencias en células HEK293T transfectadas. Adicionalmente, demostramos que clorpromazina reduce en forma crónica las corrientes postsinápticas excitatorias (EPSC y mEPSC) mientras que SKF38393 las facilita en forma aguda. Por otro lado, observamos una tendencia a que clorpromazina IP aumente las IPSC evocadas en estas neuronas. En conjunto, estos efectos opuestos de clorpromazina causaron un desbalance E/I en las neuronas de la CPFm. Finalmente, estudiamos los efectos de estos dos ligandos de los receptores tipo-D1R en la actividad transcripcional de las neuronas de la CPFm y, si bien observamos el aumento en la reactividad al factor de transcripción c-Fos inducido por SKF38393, el pretratamiento con clorpromazina no logró prevenir este efecto de manera significativa.

Discusión

En este trabajo de tesis, abordamos el estudio de la actividad constitutiva de D1R y su impacto sobre los Ca_v neuronales de la CPFm. Como aproximación farmacológica para identificar las conductancias Ca_v nativas sensibles a la actividad basal de este receptor, usamos al fármaco antipsicótico clorpromazina por su acción como agonista inverso de receptores tipo-D1R. Creemos que es importante estudiar este aspecto de la funcionalidad de D1R ya que: (1) es el receptor de dopamina más abundante en la CPFm y fuertes evidencias demuestran que los niveles de expresión y/o actividad de D1R en esta área son importantes en la fisiopatología de la esquizofrenia (Abi-Dargham et al., 2002; Thompson et al., 2014); (2) nuestros trabajos demuestran que los Ca_v son sensibles a la actividad constitutiva de otros GPCRs (Agosti et al., 2017; Lopez Soto et al., 2015); y (3) si bien está establecido *in vitro* que clorpromazina y otros antipsicóticos son agonistas inversos de los receptores tipo-D1R, se desconocen aún los efectos de esta actividad en la fisiología del cerebro (Zhang et al., 2014). El estudio de estos fármacos como agonistas inversos de los receptores tipo-D1R resulta relevante debido a su uso terapéutico. No obstante, su inespecificidad como ligandos presenta un desafío para la interpretación y extrapolación de los resultados. En esta tesis demostramos que clorpromazina afecta la funcionalidad de distintos Ca_v neuronales, y mediante un sistema *in vitro* dilucidamos cuáles de esos efectos son mediados por la actividad constitutiva de D1R. Nuestro resultado más relevante es que encontramos que la actividad constitutiva de D1R estimula selectivamente a los $Ca_v2.2$ por sobre otros subtipos de Ca_v en un sistema de expresión heteróloga y en neuronas piramidales de la capa 5/6 de la CPFm de ratón.

Los Ca_v están sometidos a procesos de regulación diferenciales

Los subtipos de Ca_v presentes en una neurona tienen diferentes propiedades biofísicas, propiedades farmacológicas y sublocalizaciones. Así, cada subtipo de canal participa de funciones neuronales específicas y está controlado por procesos de regulación diferenciales. Evidencias previas y los resultados de esta tesis demuestran que los Ca_v presentan diferencias importantes en su sensibilidad a fármacos o a la actividad de GPCRs. En particular, aquí observamos que clorpromazina, administrada tanto en forma sistémica como intra-CPFm, reduce dramáticamente las corrientes nativas Ca_v HVA en neuronas piramidales de la CPFm. Mediante el uso de bloqueantes

específicos encontramos que este efecto es diferencial sobre los distintos subtipos de Ca_v , afectando a las corrientes Ca_v1 y $Ca_v2.2$, pero no a las $Ca_v2.1$ ni a las Ca_v3 . En el caso del $Ca_v2.1$, no encontramos una contribución significativa de este subtipo a las corrientes nativas Ca_v registradas en nuestras condiciones experimentales. Esto podría explicarse por el hecho de que nuestros preparados *ex vivo* no preservan las proyecciones de las neuronas piramidales de la capa 5/6 y los $Ca_v2.1$ estarían enriquecidos en la presinapsis donde participan de la liberación de neurotransmisor, como se ha demostrado para interneuronas GABAérgicas de la CPFm (Zaitsev et al., 2007). Otros subtipos de canales que fueron insensibles a clorpromazina son los Ca_v3 , típicamente de ubicación somática y axonal, y cuya función se asocia a la excitabilidad neuronal y al disparo de potenciales de acción en la corteza y otras áreas cerebrales (Bender et al., 2012; Hu & Bean, 2018). Adicionalmente, en la CPFm se encontró que los Ca_v3 tienen un rol presináptico, asociados a la liberación de glutamato (Liu et al., 2016a; Lu et al., 2017; Luo et al., 2017). Los subtipos de canales afectados por clorpromazina, Ca_v1 y $Ca_v2.2$, se localizan en somas y dendritas de neuronas piramidales de la CPFm (Datta et al., 2021; Westenbroek et al., 1992), donde controlan los niveles de calcio somático (Heng et al., 2011; Kisilevsky et al., 2008). En particular, en las dendritas apicales de estas neuronas las corrientes tipo L y tipo N, y no las de tipo T, generan potenciales dendríticos de calcio que amplifican los EPSP (Seamans et al., 1997). Por lo tanto, proponemos que la drástica reducción de las corrientes Ca_v1 y $Ca_v2.2$ por clorpromazina podría impactar en procesos neuronales que dependen de la entrada de calcio somático actividad-dependiente.

Combinando nuestras observaciones en neuronas de la CPFm con experimentos en células HEK293T transfectadas, logramos demostrar que clorpromazina reduce las corrientes Ca_v HVA mediante dos mecanismos independientes. Por un lado, actúa como agonista inverso de los receptores tipo-D1R, reduciendo la contribución de los $Ca_v2.2$ a la corriente nativa global, efecto que fue observado también utilizando haloperidol, otro antipsicótico que actúa como agonista inverso de D1R y previene su acción sobre los $Ca_v2.2$. En segundo lugar, encontramos que clorpromazina reduce la contribución de los Ca_v1 a las corrientes nativas, evaluada como la sensibilidad de las mismas a nifedipina, y mediante ensayos *in vitro* demostramos que este antipsicótico tiene un efecto bloqueante independiente de D1R sobre los canales $Ca_v1.3$. Muchos antipsicóticos se unen y bloquean a distintos canales iónicos como los canales de calcio, de sodio y de potasio (Bianchi, 2010). En este sentido, trabajos previos mostraron que clorpromazina reduce de manera aguda a las corrientes de calcio tipo L en células PC12 (Ito et al., 1996) y en células de

neuroblastoma de ratón, estabilizando el estado inactivado estacionario del canal (Ogata et al., 1990). Si bien aquí no indagamos en el mecanismo por el cual clorpromazina bloquea las corrientes $Ca_v1.3$, para hacerlo podría construirse una curva de inactivación del estado estacionario, aplicando protocolos con pre-pulsos a distintos voltajes de larga duración previos al pulso de *test* corto donde se espera que se abran los canales remanentes disponibles que no se hallen en el estado inactivado (Bähring & Covarrubias, 2011; Pinggera et al., 2015). Por otro lado, se reportó que haloperidol, uno de los antipsicóticos usados en este trabajo de tesis, genera una inhibición fuerte, rápida y reversible sobre las corrientes Ca_v1 (Ito et al., 1996) y $Ca_v2.2$ (Zamponi, 1999), mientras que inhibe moderadamente a los Ca_v3 (Santi et al., 2002). Los efectos de estos antipsicóticos sobre un mismo tipo de canal pueden variar dependiendo del tejido y sistema experimental utilizados. Por ejemplo, haloperidol inhibe levemente a los Ca_v1 en cardiomiocitos de rata, en contraste con el marcado bloqueo de ~60% reportado en una línea celular derivada de feocromocitoma de la médula adrenal de rata (Ito et al., 1996). Aquí, realizamos controles y experimentos adicionales para evaluar si los antipsicóticos que usamos como agonistas inversos de D1R presentan un efecto inhibitorio sobre $Ca_v2.2$, el subtipo de canal que fue sensible a la actividad constitutiva de D1R. Clorpromazina y haloperidol ocluyeron el efecto de la actividad constitutiva de D1R sin modificar los niveles de corriente basal en las incubaciones previas al experimento de *patch clamp*. En estos experimentos evaluamos exclusivamente el efecto crónico de los antipsicóticos, ya que lavamos las células con solución externa libre de drogas antes de los registros electrofisiológicos. Por otro lado, analizamos el efecto agudo de concentraciones crecientes de haloperidol y clorpromazina en células transfectadas únicamente con el $Ca_v2.2$ y encontramos que haloperidol inhibió fuertemente estas corrientes, como fue reportado previamente (Zamponi, 1999), mientras que clorpromazina no tuvo efecto sobre estos canales a ninguna de las concentraciones evaluadas. Los antipsicóticos presentan efectos heterogéneos, pudiendo actuar sobre distintos blancos celulares o bien sobre el mismo blanco con efectos diferentes a corto y a largo plazo.

Los Ca_v son sensibles diferencialmente a la actividad de los GPCRs y a sus distintas vías de señalización, y los $Ca_v2.2$ son canales particularmente sensibles a este modo de activación basal. En los últimos años, nuestro laboratorio se ha dedicado a estudiar el efecto de la actividad constitutiva de GPCRs sobre los distintos subtipos de Ca_v . Por ejemplo, observamos que la actividad constitutiva de GHSR inhibe las corrientes mediadas por $Ca_v1.2$, $Ca_v1.3$, $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$. Particularmente, su actividad constitutiva reduce el tráfico de $Ca_v2.2$ desde el retículo endoplasmático hacia la

membrana celular (Lopez Soto et al., 2015; Mustafa et al., 2017). Estos trabajos sugieren que actividad basal de GHSR depende de la presencia de la subunidad $Ca_v\beta_3$ más que del subtipo de Ca_v . Por ejemplo, los Ca_v3 son insensibles a la actividad constitutiva de GHSR cuando se expresan solos, pero se ven drásticamente afectados cuando se expresan en conjunto con la subunidad auxiliar $Ca_v\beta_3$ (Mustafa et al., 2017). Por otro lado, nuestro laboratorio demostró que el MC4R reduce las corrientes $Ca_v1.2$, $Ca_v1.3$ y $Ca_v2.1$ mientras que no tiene efecto sobre los $Ca_v2.2$ (Agosti et al., 2017; Agosti et al., 2014). El MC4R es un receptor canónicamente acoplado a la proteína Gs, pero el efecto de su actividad constitutiva sobre los Ca_v es mediado por Gi/o (Agosti et al., 2017; Agosti et al., 2014; Tao, 2014). De manera similar, los efectos de la actividad constitutiva y la actividad evocada de GHSR sobre los Ca_v ocurren a través de vías de señalización intracelular diferentes, siendo la vía de Gi/o para la constitutiva y Gq para la actividad evocada (Cornejo et al., 2021; Lopez Soto et al., 2015). Otro trabajo de nuestro laboratorio reportó que los D2R inhiben basalmente las corrientes $Ca_v2.2$ en un mecanismo mediado por $G\beta\gamma$ (Cordisco Gonzalez et al., 2020) y un trabajo del grupo del Dr. Zamponi demostró que la actividad constitutiva de ORL-1 inhibe las corrientes $Ca_v2.2$ a través de la proteína Gi/o (Beedle et al., 2004). Además, se reportó que los receptores metabotrópicos de glutamato mGluR7 presentan actividad constitutiva que inhibe corrientes tipo N en neuronas del ganglio cervical superior (Kammermeier, 2015). En este contexto, nosotros encontramos que la actividad constitutiva de D1R actúa sobre un solo subtipo de canal, el $Ca_v2.2$. A nuestro conocimiento, este es el primer trabajo que demuestra que la actividad constitutiva de un GPCR estimula las corrientes Ca_v , en lugar de inhibirlas como en la mayoría de los casos reportados en la bibliografía.

Estrategias para abordar el estudio de la actividad constitutiva de GPCRs

Los GPCRs presentan dos modos de activación diferentes: la actividad evocada por la unión de ligandos y la actividad constitutiva. Actualmente se cree que todos los GPCRs, incluyendo los receptores huérfanos, presentan algún grado de actividad espontánea (Bond & IJzerman, 2006; Inoue et al., 2019) y se acepta que aún en ausencia de ligando existen en un equilibrio entre estados activos e inactivos (Costa & Herz, 1989; Chalmers & Behan, 2002). La actividad evocada actúa rápidamente en respuesta a agonistas como un modo de transmitir información sobre su entorno, activando cascadas de señalización para estimular o inhibir diferentes blancos intracelulares en forma aguda (Luttrell, 2016). Así, este modo de activación está fuertemente ligado a la concentración espacial y temporal de agonistas. En contraposición, la actividad constitutiva es intrínseca, permite que los GPCRs activen

vías intracelulares en forma tónica y así ejerzan una modulación crónica sobre sus blancos celulares (Costa & Cotecchia, 2005). Se cree que esta señalización basal depende en mayor medida de los niveles de expresión del GPCR en los distintos compartimientos celulares o microdominios de membrana. En muchos casos, se demostró que la actividad constitutiva de GPCRs actúa a través de mecanismos crónicos bien diferentes a los mecanismos de acción rápida de su actividad evocada por ligando, por ejemplo activando vías de señalización no canónicas y/o modulando el tráfico de sus proteínas blanco hacia y desde la membrana plasmática (Huang & Zamponi, 2017; Seifert & Wenzel-Seifert, 2002; Shukla, 2014). Por ejemplo, mientras que la actividad evocada por ghrelina de GHSR activa clásicamente la cascada intracelular de la proteína Gq, se reportó que su señalización independiente de ligando es capaz de reclutar Gq, Gs y Gi/o (Cornejo et al., 2021; Damian et al., 2021). Para entender la relevancia fisiológica de la actividad constitutiva es importante estudiar su efecto sobre blancos celulares específicos, sin asumir que las proteínas blanco de la actividad evocada por agonista serán igualmente sensibles a la constitutiva. En particular, la actividad evocada por dopamina de D1R modula diferencialmente a los subtipos de Ca_v . La rápida activación de los receptores tipo-D1R producida por dopamina y agonistas específicos, como el SKF38393 usado en este trabajo, inhibe en forma aguda a los $Ca_v2.1$, los $Ca_v2.2$ y los Ca_v3 (Drolet et al., 1997; Kisilevsky et al., 2008; Momiyama & Fukazawa, 2007; Pfeiffer-Linn & Lasater, 1993; Surmeier et al., 1995; Wolfe et al., 2003), mientras que facilita las corrientes Ca_v1 (Artalejo et al., 1990; Heng et al., 2011; Hernández-López et al., 1997; Pfeiffer-Linn & Lasater, 1993; Surmeier et al., 1995). Sin embargo, hasta el momento no se conocía cómo la actividad constitutiva de D1R modula a estas corrientes. En este estudio, encontramos efectos bien diferentes de la actividad evocada y constitutiva sobre los Ca_v . Mientras que se demostró que la actividad evocada de D1R modula a los Ca_v1 , $Ca_v2.1$ y Ca_v3 , estos canales fueron insensibles a su actividad constitutiva en nuestras condiciones experimentales. Por otro lado, observamos que en células HEK293T transfectadas con bajas cantidades de D1R su actividad constitutiva aumenta las corrientes $Ca_v2.2$, mientras que a niveles de expresión muy elevados de D1R encontramos un mecanismo diferente inhibitorio, que discutiremos más adelante. Además, encontramos que la actividad constitutiva y evocada de D1R tienen efectos opuestos sobre las corrientes $Ca_v2.2$. En resumen, nuestros resultados refuerzan la importancia de estudiar separadamente los posibles blancos de la actividad evocada por agonista y constitutiva de D1R y otros GPCRs.

Una manera de estudiar la señalización basal de los GPCRs es mediante la construcción de receptores mutados con actividad constitutiva alterada (Smit et al., 2007). Particularmente para D1R, se han generado muchos mutantes en los que se logró disminuir o aumentar su actividad constitutiva (Plouffe et al., 2010). Aquí utilizamos dos versiones mutadas de D1R que carecen de actividad constitutiva previamente caracterizadas mediante ensayos bioquímicos (Al-Fulaij et al., 2008; Zhang et al., 2015). En base a nuestros resultados usando estos mutantes y un agonista inverso de D1R en un sistema de expresión heteróloga, concluimos que la presencia de receptores D1R basalmente activos es necesaria para evidenciar el aumento en las corrientes $Ca_v2.2$. Ahora bien, ¿cómo se puede trasladar esta estrategia experimental a estudios *in vivo*? En este sentido, se han desarrollado numerosas líneas de ratones transgénicos que permiten estudiar la actividad constitutiva de los GPCRs, como ratones deficientes o *knockout* para un GPCR específico o ratones en los que se sustituye una secuencia génica endógena por otra diferente o modificada (ratones *knock-in*), y estas modificaciones genéticas pueden ser constitutivas o condicionales con especificidad temporal, tisular y celular (Navabpour et al., 2020). Como mencionamos previamente, los ratones deficientes para el D1R son viables pero presentan dificultades en su desarrollo y fenotipos severos en aspectos motores (Holmes et al., 2004). Otra estrategia utilizada para estudiar las funciones de D1R fue la generación de una línea transgénica con ablación selectiva de las neuronas piramidales que expresan D1R en la corteza cerebral de ratones (Jiang et al., 2015). Sería interesante estudiar los efectos de clorpromazina, el agonista inverso de los tipo-D1R, estos modelos animales transgénicos y compararlos con nuestros resultados en ratones salvajes. A diferencia de las líneas *knockout*, en los ratones *knock-in* que expresan versiones mutadas de GPCRs se altera o se elimina la actividad constitutiva sin modificar la actividad evocada por ligando de estos receptores (Rojo et al., 2020; Torz et al., 2020). Tal vez una alternativa más atractiva sería estudiar la actividad constitutiva del D1R en líneas *knock-in* que expresen alguna de las versiones mutadas de D1R que se caracterizaron *in vitro*, estrategia que se ha utilizado para estudiar las funciones de D5R en el sistema renal (Liu et al., 2015; Wang et al., 2019). Si bien estos GPCRs mutados presentan actividad constitutiva reducida en sistemas *in vitro*, una posible complicación de los ratones *knock-in* es que los GPCRs mutantes no se expresen al mismo nivel que los receptores salvajes. En todo caso, es importante utilizar estos modelos animales con cautela y entendiendo que en el animal entero pueden existir compensaciones, deficiencias en la expresión y el tráfico de los receptores mutados.

Otra estrategia experimental utilizada para estudiar las consecuencias intracelulares de la actividad constitutiva de los GPCRs es la aplicación de agonistas inversos. Los dos modos de actividad de los GPCRs pueden ser modulados por ligandos como agonistas, antagonistas y agonistas inversos, para controlar diferencialmente la actividad evocada y constitutiva. En este trabajo de tesis, utilizamos distintos ligandos específicos para modular la actividad de D1R en un sistema de expresión heteróloga: dopamina para inducir su actividad evocada; los agonistas inversos clorpromazina y haloperidol para reducir su actividad constitutiva; y el antagonista SCH23390 para bloquear el efecto del agonista o de los agonistas inversos. Un problema que puede surgir al utilizar ligandos es que muchos de ellos no son puros, sino que pueden presentar más de una acción dependiendo de las condiciones experimentales (Hoyer & Boddeke, 1993). Por ejemplo, se reportó que algunos ligandos de GHSR que son antagonistas para una vía de señalización intracelular pueden actuar al mismo tiempo como agonistas parciales o agonistas inversos para otras vías de señalización (Mende et al., 2018). En este trabajo, observamos SCH23390 actuó como antagonista impidiendo los efectos de dopamina sobre el contenido de AMPc y sobre la inhibición de las corrientes $Ca_v2.2$ en forma aguda y crónica, como fue reportado previamente (Bourne, 2001; Goutier et al., 2015; Kisilevsky et al., 2008; Liu et al., 2016b). Adicionalmente, encontramos un sorpresivo aumento del AMPc basal en células incubadas crónicamente con SCH23390 en ausencia de dopamina, sin afectar los niveles de AMPc en forma aguda. Este efecto peculiar podría deberse a que en algunas condiciones experimentales SCH23390 presente actividad de agonista parcial, como fue observado en trabajos previos (Al-Fulaij et al., 2008; Tiberi & Caron, 1994). Creemos que es importante evaluar exhaustivamente las acciones de cada ligando en los sistemas experimentales utilizados, teniendo en cuenta que los ligandos no siempre son puros y que sus efectos pueden ser complejos.

El uso de ligandos en sistemas nativos para estudiar la actividad de GPCRs presenta dificultades debido a la presencia de ligandos endógenos y la inespecificidad de los ligandos disponibles (Meye et al., 2014). Aquí, nuestra estrategia farmacológica consistió en administrar *in vivo*, mediante diferentes vías (IP e intra-CPFM) y a diferentes tiempos, un agonista (SKF38393), un agonista inverso (clorpromazina) y un antagonista (SCH23390) de los receptores tipo-D1R, para estudiar aspectos de su actividad constitutiva y evocada en la CPM. Un desafío particular en nuestro trabajo fue aislar el efecto de clorpromazina como agonista inverso de los receptores tipo-D1R en rebanadas de cerebro, ya que clorpromazina podría actuar sobre otros blancos celulares, generando compensaciones de su efecto sobre los tipo-D1R y *cross-talk* entre

cascadas de señalización. Para abordar este problema, antagonizamos el efecto de clorpromazina IP sobre los receptores tipo-D1R mediante la administración previa y localizada (CPFm) de SCH23390. Dada la alta especificidad y afinidad del SCH23390 por los receptores tipo-D1R (Bourne, 2001; Neiens et al., 2015), esta intervención farmacológica nos permitió discernir si clorpromazina estaba actuando sobre la actividad constitutiva de tipo-D1R o sobre otros blancos moleculares. Esta misma estrategia fue utilizada anteriormente en un estudio *in vitro* que evaluó la actividad de la adenilato ciclasa en células PC2 transfectadas con D1R y tratadas con sus agonistas inversos clozapina y flufenazina (Cai et al., 1999). En un modelo murino de enfermedad de Parkinson, se observó que inhibir la actividad constitutiva de D5R con el antipsicótico flupentixol previene el fenotipo patológico de disparos en ráfaga en neuronas subtalámicas (Chetrit et al., 2013). Más recientemente, se encontró que el SCH23390 ocluye el efecto de los agonistas inversos flupentixol y clozapina sobre la actividad constitutiva de D5R en rebanadas del cuerpo estriado provenientes de ratones con disquinesia (Paz, 2022). Nosotres encontramos que SCH23390, administrado tanto *in vivo* como *in vitro*, previene la acción de clorpromazina sobre el efecto estimulador de la actividad constitutiva de D1R sobre los $Ca_v2.2$. Los experimentos que llevamos a cabo en el sistema de expresión heteróloga de células HEK293T fueron útiles para estudiar en forma más controlada los efectos observados en neuronas de la CPFm. Así, logramos reproducir en células HEK293T transfectadas el efecto de D1R sobre los $Ca_v2.2$, sobre-expresando únicamente nuestras proteínas de interés, lo que sugiere que, en principio, no serían necesarios otros receptores para este efecto. En resumen, el uso de ligandos específicos combinando sistemas nativos y heterólogos es un enfoque metodológico útil para aislar los efectos de la actividad constitutiva de GPCRs (Schneider & Seifert, 2010) y, en este trabajo, nos permitió dilucidar qué subtipos de Ca_v son sensibles a la actividad constitutiva de D1R.

La actividad constitutiva de D1R estimula las corrientes $Ca_v2.2$

En este trabajo demostramos que la actividad constitutiva de D1R aumenta las corrientes $Ca_v2.2$ en un sistema de expresión heteróloga y que este mecanismo depende de (1) la actividad constitutiva de D1R, (2) la interacción física entre D1R y $Ca_v2.2$ y (3) la activación crónica de la proteína Gs. A nuestro conocimiento, este es el primer reporte de una modulación de canales iónicos presentes en neuronas por la actividad constitutiva de D1R.

Nuestros resultados indican que la modulación de $Ca_v2.2$ por la actividad constitutiva de D1R requiere de la interacción física entre estas proteínas, en acuerdo con un trabajo previo que reportó una interacción física entre el segmento *loop 2* intracelular de D1R y la región C-terminal proximal de $Ca_v2.2$ mediante ensayos de co-inmunoprecipitación (Kisilevsky et al., 2008). Si bien este reporte mostraba que la interacción favorece la presencia del canal en la membrana plasmática, no se había evaluado aún su impacto sobre la corriente $Ca_v2.2$ ni el requerimiento de la actividad constitutiva de D1R. Aquí, encontramos que la sobre-expresión del péptido *loop 2* de D1R o del péptido C-terminal del $Ca_v2.2$ en células HEK293T revierte el aumento de corriente basal a niveles control, mientras que el *loop 1*, un péptido de D1R que no participa de la interacción física, no revierte este efecto. Podemos pensar que los péptidos cortos D1R *loop 2* y $Ca_v2.2$ C-terminal sobre-expresados competirían por la interacción física con el canal o con el receptor, respectivamente. En base a la contundencia de estos resultados en el sistema de expresión heteróloga, nos propusimos evaluar si la sobre-expresión del péptido *loop 2* *in vivo* mediante vectores virales adenoasociados podría prevenir el efecto estimulador de la actividad constitutiva de los receptores tipo-D1R sobre los $Ca_v2.2$ en neuronas de la CPFm, pero no alcanzamos a realizar estos experimentos en los tiempos de esta tesis.

El uso de péptidos para interrumpir interacciones físicas entre proteínas es una estrategia ampliamente utilizada y ha sido propuesta como posible terapia para tratar patologías asociadas a la formación de complejos proteicos (Hasbi et al., 2014). Por ejemplo, en un estudio realizado en neuronas hipocámpales, se observó que la aplicación aguda de un péptido con la secuencia C-terminal de D1R interrumpe la interacción física entre D1R y receptores NMDA, favoreciendo la redistribución de los receptores NMDA desde sitios perisinápticos hacia la postsinapsis (Ladepêche et al., 2013). Recientemente se demostró que el mismo péptido interrumpe la interacción física entre D5R y los receptores $GABA_A$, generando una redistribución de ambas proteínas en la membrana y una disminución de las IPSC en neuronas hipocámpales (Maingret & Groc, 2021). En estos últimos dos trabajos aplicaron un péptido exógeno y capaz de atravesar la membrana plasmática y observaron sus efectos a corto plazo, mientras que en nuestro estudio expresamos los péptidos en células HEK293T transfectadas y estudiamos sus efectos en forma crónica. De manera similar, un trabajo demostró que la coexpresión de un péptido de D1R interrumpe la interacción física entre D1R y D2R *in vitro* (Hasbi et al., 2014). Sería interesante evaluar en estos reportes si la actividad constitutiva de D1R y D5R es requerida para que se produzca su interacción física con otras proteínas. En esta tesis, nuestros resultados utilizando un mutante de D1R indican

que es necesario que D1R se encuentre constitutivamente activo para aumentar la densidad de $Ca_v2.2$ funcionales en la membrana. Un experimento interesante para complementar nuestros estudios sería realizar ensayos de FRET para evaluar si la interacción física de D1R y $Ca_v2.2$ no ocurre en presencia de clorpromazina, de un inhibidor de la proteína Gs o sustituyendo el D1R salvaje por un mutante sin actividad constitutiva.

¿Cómo es que esta interacción física entre D1R y $Ca_v2.2$ produce una mayor amplitud de corriente? D1R podría modificar propiedades biofísicas del canal, por ejemplo, aumentando su probabilidad de apertura, o bien podría impactar en el tráfico de $Ca_v2.2$ hacia y desde la membrana plasmática. En particular, Kisilevsky *et al.* (2008) estudiaron esta segunda posibilidad mediante ensayos de microscopía confocal utilizando versiones de $Ca_v2.2$ y D1R marcadas con la proteína fluorescente YFP o con el epítipo de hemaglutinina. Observaron que la expresión del canal en membrana fue significativamente mayor en células que coexpresaban D1R y lograron prevenir ese aumento con la sobre-expresión del *loop 2* o con la incubación prolongada con dopamina (Kisilevsky *et al.*, 2008). Aquí, evaluamos si la actividad constitutiva de D1R modula la expresión de $Ca_v2.2$ en la membrana plasmática en nuestras condiciones experimentales con ensayos de imágenes y de *patch clamp*. Primero, transfectamos células HEK293T con un clon de $Ca_v2.2$ ligado a GFP en ausencia o presencia de D1R y evaluamos su expresión en membrana con un microscopio de epifluorescencia, sin encontrar diferencias significativas. Es posible que esta técnica no sea lo suficientemente sensible para detectar un cambio moderado en la expresión del canal en membrana. En otra serie de experimentos, registramos las corrientes de compuerta o *gating* de apertura del $Ca_v2.2$. Está bien establecido que estas corrientes se producen debido al movimiento de los residuos cargados positivamente presentes en los segmentos S4 sensores de voltaje de cada canal, por lo que refleja el número total de canales funcionales presentes en la superficie celular (Bezanilla, 2000). Las corrientes de *gating* preceden a la apertura del poro y, por ende, al inicio de la corriente iónica. Como estas dos corrientes no están perfectamente resueltas en el tiempo, registramos las corrientes de *gating* al potencial de reversión donde el flujo neto de iones a través del poro es indetectable (Castiglioni *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 1999; McNaughton & Randall, 1997). Encontramos que la coexpresión de D1R aumentó significativamente la las corrientes de *gating* y que este efecto fue ocluido por la sobre-expresión del *loop 2* o por la sustitución de D1R por el mutante D1RS199A. Medir las corrientes de *gating* al potencial de reversión sin utilizar drogas específicas que bloqueen el poro del canal, nos permitió registrar las corrientes de *gating* y las corrientes iónicas en las mismas células.

Analizamos la correlación entre las corrientes de *gating* y las corrientes de cola, lo que nos permitió descartar diferencias en la probabilidad de apertura de $Ca_v2.2$ en nuestras condiciones experimentales (Jones et al., 1999). En resumen, nuestras observaciones sugieren que la actividad constitutiva de D1R aumenta la densidad de $Ca_v2.2$ en la membrana plasmática y que la formación del complejo receptor-canal es crucial para que esto ocurra.

Una función de la actividad constitutiva de D1R podría ser controlar la densidad y la sub-localización específica de los $Ca_v2.2$ en neuronas. El tiempo de tratamiento con clorpromazina (24 horas) efectivo para alterar las corrientes $Ca_v2.2$ en la CPFm es comparable con los tiempos de *turnover* reportados para este canal (Bernstein & Jones, 2007; Simms & Zamponi, 2012). Los $Ca_v2.2$, típicamente canales presinápticos, presentan una distribución peculiar en las neuronas piramidales de la CPF, encontrándose principalmente en regiones somáticas y dendríticas. El efecto de D1R podría contribuir a esta distribución postsináptica, junto a otros moduladores. Por ejemplo, se demostró recientemente que la proteína mediadora de respuesta a colapsinas 2 (CRMP2) aumenta los niveles de expresión de $Ca_v2.2$ en neuronas de la CPF, un efecto asociado a la adicción a cocaína (Buchta et al., 2020). Así, es posible que $Ca_v2.2$ tenga un rol no canónico en sitios postsinápticos de las neuronas de la CPFm y que D1R, entre otros moduladores, establezca a los $Ca_v2.2$ en estos sitios. Como mencionamos en la introducción, existen otras regiones del sistema nervioso en donde $Ca_v2.2$ tendría esta distribución peculiar, como el cerebelo, el hipocampo y la médula espinal (Hamilton et al., 2010; Heinke et al., 2004; Westenbroek et al., 1992). Sería interesante explorar si la actividad constitutiva de D1R tiene un rol en estas otras áreas.

Para nuestra sorpresa, el efecto estimulante de la actividad constitutiva de D1R sobre los $Ca_v2.2$, al igual que el efecto inhibitorio agudo por dopamina, requiere de la activación de proteína Gs, lo que agrega un nuevo nivel de complejidad a este mecanismo. Así, la proteína Gs en su forma activa podría formar parte del complejo receptor-canal y/o activar una cascada intracelular en forma crónica que modifique a D1R y/o a $Ca_v2.2$. En este contexto, sería interesante explorar la contribución de proteínas activadas corriente abajo de Gs al efecto de la actividad constitutiva de D1R. Por ejemplo, podríamos incubar las células con distintos inhibidores comerciales de la AC y/o la PKA para estudiar las consecuencias intracelulares de la activación de D1R (Guitart et al., 2019; Zhang et al., 2017). Otra opción sería utilizar versiones mutantes de Gs que presentan diferentes alteraciones, tales como la reducción de su afinidad por GDP, la incapacidad de adquirir una conformación activa y unirse a GTP, o mutantes de D1R incapaces de reclutar al complejo heterotrimérico de Gs (Cabrera-Vera et al.,

2003; Iiri et al., 1999; Lee et al., 1992; Zhuang et al., 2021). Estas estrategias podrían ser útiles para determinar si el efecto de D1R requiere únicamente la unión física de Gs o bien de este acople y de la activación de la cascada intracelular.

La modulación opuesta de la actividad constitutiva y evocada por dopamina de D1R sobre los $Ca_v2.2$ se asemeja a lo reportado previamente para D1R, D2R y ORL-1 (Beedle et al., 2004; Huang & Zamponi, 2017; Kisilevsky et al., 2008; Kisilevsky & Zamponi, 2008a). Por lo tanto, el efecto dual de D1R sobre los $Ca_v2.2$ (crónico-estimulador *versus* agudo-inhibitorio) podría ser un ejemplo de un comportamiento común para muchos GPCRs. Adicionalmente, en este trabajo de tesis observamos que el efecto inhibitorio de SKF38393, un agonista sintético específico para D1R y D5R, sobre las corrientes Ca_v HVA se vio reducido en neuronas con una actividad constitutiva de tipo-D1R reducida (animales tratados con clorpromazina). Teniendo en cuenta que $Ca_v2.2$ es altamente sensible a las cascadas de señalización de proteínas G, postulamos que las neuronas que expresen D1R tendrían niveles más altos de corrientes de calcio sensibles a la acción aguda de dopamina. En base a estos antecedentes y a nuestros resultados, planteamos el siguiente modelo: D1R constitutivamente activo interactúa físicamente con $Ca_v2.2$ y promueve su localización en la membrana plasmática, amplificando una corriente de calcio blanco de las acciones de la actividad tipo-D1R evocada por dopamina, incluyendo tanto la inhibición aguda como la co-internalización del complejo canal-receptor inducida por la unión prolongada de dopamina. Este mecanismo de modulación de $Ca_v2.2$ altamente dinámico podría tener consecuencias fisiológicas en procesos postsinápticos.

Elevados niveles de expresión de D1R inhiben las corrientes $Ca_v2.2$

Aquí mostramos que la modulación de D1R sobre los $Ca_v2.2$ depende del nivel de expresión de este receptor en forma dual o de “U” invertida, hecho que difiere del comportamiento reportado para el grado de actividad constitutiva de otros GPCRs en relación a su nivel de expresión (Beedle et al., 2004; Cordisco Gonzalez et al., 2020; Lopez Soto et al., 2015). Observamos que la actividad constitutiva de D1R aumenta las corrientes $Ca_v2.2$ de manera proporcional al nivel de expresión del receptor hasta un máximo que se da a la proporción molar D1R: $Ca_v2.2$ igual a 0,1. A partir de este punto, el efecto estimulador se revierte. Adicionalmente, encontramos que a niveles de expresión de D1R muy elevados aparece un efecto inhibitorio sobre las corrientes $Ca_v2.2$ que es independiente de la cascada de señalización de la proteína Gs y que no se revierte al incubar las células con un agonista inverso de D1R, lo cual sugiere un

mecanismo independiente de su actividad constitutiva. Nuestros resultados en neuronas de la CPFm indican que la actividad constitutiva de los receptores tipo-D1R aumenta las corrientes $Ca_v2.2$. Si bien no existen registros de la proporción nativa de D1R y $Ca_v2.2$ en neuronas de la CPFm, una posibilidad es que la expresión nativa de D1R sea comparable a las condiciones experimentales de células HEK293T transfectadas con bajas cantidades de D1R. En este contexto, nos preguntamos qué ocurriría con los niveles de corriente si sobre-expresáramos D1R en neuronas de la CPFm. Se podría evaluar la contribución de los $Ca_v2.2$ en cultivos primarios de neuronas de la CPFm con niveles de expresión nativa de D1R (control) o sobre-expresando este receptor mediante vectores lentivirales, una estrategia utilizada en varias ocasiones en nuestro laboratorio para evaluar el efecto de la actividad constitutiva de GHSR sobre las corrientes Ca_v (Cordisco Gonzalez et al., 2020; Lopez Soto et al., 2015; Martinez Damonte et al., 2018). En estudios *in vivo* se observó que protocolos de ejercicio físico y cognitivo pueden modular los niveles de expresión de D1R en la CPFm (Kintz et al., 2017; Ko et al., 2019; Koizumi et al., 2021; Luvuno et al., 2020). Así, sería interesante sobre-expresar D1R o silenciar su expresión con ARN de interferencia *in vivo* en la CPFm utilizando vectores virales, y evaluar el efecto de estas intervenciones sobre las corrientes Ca_v nativas.

La pérdida del efecto estimulador de D1R sobre las corrientes $Ca_v2.2$ cuando D1R está expresado a altas concentraciones o cuando está coexpresado con D2R podría deberse a la formación homo-dímeros y oligómeros o complejos con D2R, como como ha sido descrito previamente (Casadó-Anguera et al., 2019; Kong et al., 2006; O'Dowd et al., 2011; Vekshina et al., 2017). Asimismo, observamos un aumento en la sensibilidad a dopamina en células que expresan altos niveles de D1R, en comparación con las condiciones con bajos niveles de expresión. En este sentido, se ha postulado que la formación de dímeros puede generar efectos cooperativos de los sitios de unión, aumentando o reduciendo la sensibilidad a ligandos (Franco et al., 2006). Considerando que pudimos ocluir la interacción física de D1R y $Ca_v2.2$ con péptidos cortos, creemos que es posible que al aumentar el nivel de expresión de D1R se favorezca la interacción física entre receptores por sobre la interacción con el canal. No obstante, serían necesarios experimentos adicionales con técnicas específicas para estudiar interacciones físicas entre proteínas tales como FRET, coimmunoprecipitación, análisis de imágenes a nivel de molécula única y ensayos de ligadura de proximidad (Busnelli et al., 2013; Faron-Górecka et al., 2019; Kasai & Kusumi, 2014; Skieterska et al., 2013; Truong & Ikura, 2001). Por otro lado, la formación de dímeros podría favorecer la activación de cascadas de señalización de proteínas G no canónicas para D1R, como se ha reportado en numerosas ocasiones para heterodímeros con el D2R (Borrotto-

Escuela & Fuxe, 2017). Sería interesante evaluar si la posible formación de dímeros de D1R es responsable del efecto inhibitorio sobre los $Ca_v2.2$ observado a altos niveles de expresión de D1R.

Clorpromazina modula la respuesta postsináptica en neuronas de la CPFm

Dado que clorpromazina reduce selectivamente dos subtipos de canales involucrados en el control del calcio somático en las neuronas de la CPFm, hipotetizamos que esto podría impactar en procesos postsinápticos dependientes de calcio. Para confrontar esta hipótesis, registramos las EPSC evocadas por estimulación eléctrica y observamos que clorpromazina redujo su amplitud significativamente. Esta disminución podría deberse, o bien a mecanismos a nivel presináptico, como un mayor número de contactos sinápticos, de espinas dendríticas y/o cambios en la probabilidad de liberación de vesículas sinápticas (Malinow & Tsien, 1990), o a cambios a nivel de la postsinapsis, como una mayor inserción y/o fosforilación de los receptores AMPA en la membrana postsináptica (Huganir & Nicoll, 2013; Lee et al., 2000). Con el fin de esclarecer este efecto, registramos las mEPSC en neuronas provenientes de animales tratados con vehículo o clorpromazina. La amplitud de las corrientes miniatura es un parámetro fuertemente asociado al número de receptores postsinápticos disponibles y la sensibilidad de los mismos; mientras que cambios en la frecuencia de las corrientes miniatura responden a mecanismos presinápticos, generalmente cambios en la frecuencia de liberación de vesículas sinápticas (Kavalali, 2015). Aquí observamos que clorpromazina IP redujo tanto la amplitud y como la frecuencia promedio de las mEPSC. Este resultado sugiere que el efecto de clorpromazina sobre las EPSC es consecuencia de cambios en la postsinapsis y la presinapsis. Es posible que el efecto postsináptico de clorpromazina se deba a la menor disponibilidad de receptores AMPA en la membrana postsináptica, un mecanismo común dependiente de calcio que permite cambios en la respuesta postsináptica excitatoria (Kennedy, 2000). En base a estas observaciones, pensamos que la menor densidad de corriente Ca_v HVA (Ca_v1 y $Ca_v2.2$) causada por clorpromazina en la postsinapsis significaría un menor ingreso de calcio ante despolarizaciones prolongadas de membrana y, por ende, alteraría mecanismos de plasticidad a largo plazo.

Registramos las corrientes inhibitorias y encontramos que clorpromazina IP tiende a aumentar las IPSC evocadas, sin modificar la amplitud o la frecuencia de los mIPSC. Este efecto fue inesperado y creemos que es independiente de los efectos de clorpromazina sobre los canales de calcio y la actividad basal de tipo-D1R en las

neuronas piramidales. Estudios previos reportaron efectos de clorpromazina sobre la neurotransmisión GABAérgica. Por ejemplo, se observó que tratamientos crónicos con clorpromazina IP aumentaron los niveles de GABA en la corteza cerebral (Agrawal et al., 1969), mientras que redujeron la densidad de receptores GABA_A en hipocampo y corteza temporal (Farnbach-Pralong et al., 1998). Por otro lado, se reportó que la aplicación aguda de clorpromazina aumenta la frecuencia al mismo tiempo que reduce la amplitud de los mIPSC registrados en cultivos primarios de hipocampo (Mozrzymas et al., 1999a; Mozrzymas et al., 1999b). Más recientemente, se propuso que clorpromazina actúa sobre interneuronas en la CPFm y aumenta la inhibición cortical (López-Gil et al., 2010). Así, creemos que el impacto de clorpromazina sobre la neurotransmisión GABAérgica podría incluir varios blancos moleculares incluyendo a los receptores GABAérgicos.

Las neuronas y los circuitos coordinan sus *inputs* excitatorios e inhibitorios para establecer y mantener una relación E/I constante (Bhatia et al., 2019; Khakhalin et al., 2014; Wehr & Zador, 2003). Trabajos previos demostraron que el balance E/I en neuronas de la CPF puede ser modificado farmacológicamente (Den Boon et al., 2015; Zhao et al., 2020) y que se encuentra alterado en desórdenes neurológicos como la esquizofrenia (Gao & Penzes, 2015; He & Cline, 2019). Por ejemplo, recientemente se reportó un aumento del balance E/I en la CPF en un modelo murino genético de esquizofrenia (Pafundo et al., 2021). Aquí, encontramos que el tratamiento con clorpromazina, un antipsicótico de uso frecuente en el tratamiento de la esquizofrenia, redujo significativamente el balance E/I de las respuestas postsinápticas evocadas.

Finalmente, encontramos que SKF38393, un agonista específico de receptores tipo-D1R, aumentó la respuesta postsináptica evaluada a través del tamaño de los EPSC y la reactividad al factor de transcripción c-Fos. La aplicación aguda de SKF38393 facilitó los EPSC, en concordancia con trabajos previos que muestran que dopamina y SKF38393 facilitan los EPSC en la CPF, en la corteza entorrinal y en el cuerpo estriado (Glovaci et al., 2014; Gonzalez-Islas & Hablitz, 2003; Umemiya & Raymond, 1997). Además, en la CPFm de animales tratados con SKF38393 observamos un aumento en el número de núcleos positivos para c-Fos, como se vio en trabajos previos para la CPF (Diaz & Dickenson, 1997; Felipe et al., 2021; Numa et al., 2019; Wass et al., 2013) y para otras regiones que expresan D1R, como el hipotálamo (Bender et al., 1997; Chocyk et al., 2008). Evaluamos el efecto de clorpromazina sobre ambos efectos del SKF38393 y, aunque no observamos cambios en el aumento de los EPSC, encontramos una tendencia a un menor aumento de la actividad transcripcional inducido por SKF38393 en animales pre-tratados con clorpromazina.

Relevancia clínica de estudiar ligandos de los receptores tipo-D1R

Clorpromazina es un potente antipsicótico de primera generación que mantiene su relevancia clínica aún 70 años después de su descubrimiento (Boyd-Kimball et al., 2018). A pesar de que este fármaco tiene muchos metabolitos activos que son capaces de cruzar la barrera hematoencefálica, se demostró que la clorpromazina inalterada es la principal responsable de sus efectos en el cerebro (Alfredsson et al., 1977). El reposicionamiento de drogas de larga data resulta una estrategia atractiva teniendo en cuenta los largos tiempos y elevados costos necesarios para que nuevos medicamentos lleguen a mostrador (Abbruzzese et al., 2020). Por ejemplo, recientemente se ha evidenciado un rol neuroprotector de clorpromazina en un modelo de rata de ataque isquémico, mejorando las alteraciones en la barrera hematoencefálica, la inflamación y la apoptosis (Guo et al., 2021). Clorpromazina se propuso como tratamiento posible para varias patologías como cáncer de mama, gliomas malignos e infestaciones por helmintos parásitos (Abbruzzese et al., 2020; Weeks et al., 2018; Yang et al., 2019). Además, estudios recientes identificaron a clorpromazina como candidato para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda y muestran que la administración *in vitro* e *in vivo* de clorpromazina presenta propiedades anti-leucémicas en ratones y larvas de pez cebra (Gundersen et al., 2022; Rai et al., 2020). En este sentido, descubrir nuevos blancos celulares de clorpromazina, como los receptores tipo-D1R, es importante para comprender los mecanismos de acción de su efecto terapéutico y de sus efectos adversos, así como también para el reposicionamiento de esta droga actualmente disponible comercialmente.

En los últimos años se han propuesto varias terapias basadas en receptores tipo-D1R para el tratamiento de los déficits cognitivos causados por la esquizofrenia y otros desórdenes psiquiátricos (Abi-Dargham et al., 2022; Arnsten et al., 2017). Se cree que niveles óptimos de estimulación de los receptores D1R son clave para la cognición mediada por la CPF (Braun et al., 2021), pero establecer con exactitud este rango óptimo de activación resulta dificultoso. En este sentido, la actividad constitutiva de D1R podría ser un factor relevante no considerado. Actualmente, muchas investigaciones están dedicadas al descubrimiento y el desarrollo de nuevos ligandos de D1R con propiedades farmacocinéticas más favorables y mayor selectividad, o al mejoramiento de ligandos ya existentes que puedan ser probados en el tratamiento de desórdenes psiquiátricos (Arnsten et al., 2017). Así, se ha explorado el posible uso de agonistas parciales, agonistas completos, antagonistas y moduladores alostéricos positivos de D1R en el tratamiento de enfermedades psiquiátricas (Desai et al., 2021; Hall et al.,

2018; Jones-Tabah et al., 2021). Por ejemplo, el uso de ecopipam (o SCH39166), un antagonista de los tipo-D1R análogo al SCH23390 usado en este trabajo de tesis, fue evaluado en ensayos clínicos para el tratamiento de esquizofrenia, abuso de drogas y obesidad (Astrup et al., 2007; Haney et al., 2001; Khasnavis et al., 2016). Por otra parte, dihidrexidina fue el primer agonista de los receptores tipo-D1R para el que se demostró biodisponibilidad en el sistema nervioso central luego de su administración sistémica. Se realizaron ensayos clínicos para probar su uso terapéutico en pacientes con esquizofrenia y enfermedad de Parkinson, pero este ligando tuvo varias limitaciones, tales como una baja biodisponibilidad por vía oral y una metabolización demasiado rápida (Blanchet et al., 1998; Mu et al., 2007). Otros agonistas completos de los receptores tipo-D1R han sido reportados e incluso algunos fueron testeados en pacientes con resultados prometedores, pero su comercialización no prosperó debido a su baja biodisponibilidad, tolerancia, efectos secundarios asociados a D2R, entre otros motivos (Abi-Dargham et al., 2022; Arnsten et al., 2017; Jones-Tabah et al., 2021). En este trabajo de tesis, estudiamos los efectos de clorpromazina, un ligando no-canónico de D1R, y creemos que nuestros resultados pueden contribuir al estudio de la farmacología clínica de D1R. En conclusión, el estudio de los mecanismos celulares y el impacto fisiológico de la actividad de receptores D1R podría contribuir a mejorar los tratamientos basados en antipsicóticos actualmente utilizados, e inclusive al desarrollo de drogas más eficientes.

Conclusiones

En este trabajo de tesis, estudiamos el impacto de la actividad constitutiva de los receptores tipo-D1R en las corrientes $Ca_v2.2$ nativas en la postsinapsis de neuronas piramidales de la CPFm utilizando una herramienta farmacológica clínicamente relevante: clorpromazina, un antipsicótico y agonista inverso de los receptores tipo-D1R. Demostramos un efecto selectivo de la actividad constitutiva de receptores tipo-D1R sobre las corrientes nativas de calcio mediadas por $Ca_v2.2$ en la CPFm.

Encontramos que la administración sistémica de clorpromazina ocluye el efecto estimulador de D1R sobre los $Ca_v2.2$ y, adicionalmente, inhibe directamente las corrientes mediadas por Ca_v1 . Comprobamos que ambos efectos de clorpromazina se deben su acción local en la CPFm. y que el efecto sobre los $Ca_v2.2$ depende de la acción de clorpromazina sobre los D1R, mientras que la inhibición de los Ca_v1 es independiente de D1R y corresponde a un efecto directo del antipsicótico sobre los canales.

Caracterizamos el mecanismo por el cual D1R aumenta las corrientes $Ca_v2.2$ en un sistema de expresión heterólogo y encontramos que esta modulación involucra la interacción física entre D1R y $Ca_v2.2$ y la presencia de la proteína Gs crónicamente activa, para producir un aumento del número de canales funcionales presentes en la membrana plasmática.

Finalmente, encontramos que la administración IP de clorpromazina redujo la amplitud de las EPSC evocadas y la amplitud de las mEPSC, sin modificar la frecuencia de las mEPSC, indicando que este efecto tiene un origen postsináptico. Además, clorpromazina mostró una tendencia a aumentar las IPSC evocadas, sin modificar las mIPSC. En conjunto, clorpromazina causó alteraciones en el balance excitación/inhibición en las neuronas piramidales de la CPFm.

En base a nuestros resultados proponemos el siguiente modelo: la actividad constitutiva de D1R aumenta la densidad de $Ca_v2.2$ en las membranas postsinápticas de neuronas de la CPF, favoreciendo un mayor ingreso de calcio que podría impactar en la neurotransmisión excitatoria. En conjunto nuestros datos nos permiten postular un rol fisiológico específico para D1R, un GPCR con actividad constitutiva que se expresa a altos niveles en la CPFm y cuya actividad basal no ha sido estudiada en profundidad.

Bibliografía

- Abbruzzese, C., Matteoni, S., Persico, M., Villani, V., & Paggi, M. G. (2020). Repurposing chlorpromazine in the treatment of glioblastoma multiforme: analysis of literature and forthcoming steps. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, *39*(1), 1-3. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-1534-z>
- Abe, K., Niikura, Y., Fujimoto, T., Akaishi, T., & Misawa, M. (2008). Involvement of dopamine D2 receptors in the induction of long-term potentiation in the basolateral amygdala–dentate gyrus pathway of anesthetized rats. *Neuropharmacology*, *55*(8), 1419-1424. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.09.005>
- Abi-Dargham, A., Javitch, J. A., Slifstein, M., Anticevic, A., Calkins, M. E., Cho, Y. T., . . . Gur, R. E. (2022). Dopamine D1R Receptor Stimulation as a Mechanistic Pro-cognitive Target for Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, *48*(1), 199-210. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbab095>
- Abi-Dargham, A., Mawlawi, O., Lombardo, I., Gil, R., Martinez, D., Huang, Y., . . . Van Heertum, R. (2002). Prefrontal dopamine D1 receptors and working memory in schizophrenia. *Journal of Neuroscience*, *22*(9), 3708-3719. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-09-03708.2002>
- Agosti, F., Gonzalez, S. C., Damonte, V. M., Tolosa, M. J., Di Siervi, N., Schioth, H., . . . Raino, J. (2017). Melanocortin 4 receptor constitutive activity inhibits L-type voltage-gated calcium channels in neurons. *Neuroscience*, *346*, 102-112. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.01.007>
- Agosti, F., López Soto, E. J., Cabral, A., Castrogiovanni, D., Schioth, H. B., Perelló, M., & Raino, J. (2014). Melanocortin 4 receptor activation inhibits presynaptic N-type calcium channels in amygdaloid complex neurons. *European Journal of Neuroscience*, *40*(5), 2755-2765. <https://doi.org/10.1111/ejn.12650>
- Agrawal, H., Davis, J., Haynes, E., & Himwich, W. (1969). Chlorpromazine and GABA. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *166*(1), 225-234. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1969.tb54273.x>
- Al-Fulaij, M. A., Ren, Y., Beinborn, M., & Kopin, A. S. (2008). Pharmacological analysis of human D1 AND D2 dopamine receptor missense variants. *Journal of Molecular Neuroscience*, *34*(3), 211. <https://doi.org/10.1007/s12031-007-9030-x>
- Alfredsson, G., Wiesel, F.-A., & Skett, P. (1977). Levels of chlorpromazine and its active metabolites in rat brain and the relationship to central monoamine metabolism and prolactin secretion. *Psychopharmacology*, *53*(1), 13-18. <https://doi.org/10.1007/BF00426688>
- Anastasiades, P. G., & Carter, A. G. (2021). Circuit organization of the rodent medial prefrontal cortex. *Trends in Neurosciences*, *44*(7), 550-563. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2021.03.006>
- Arnsten, A. F., Girgis, R. R., Gray, D. L., & Mailman, R. B. (2017). Novel dopamine therapeutics for cognitive deficits in schizophrenia. *Biological psychiatry*, *81*(1), 67-77. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.12.028>
- Artalejo, C. R., Ariano, M. A., Perlman, R. L., & Fox, A. P. (1990). Activation of facilitation calcium channels in chromaffin cells by D1 dopamine receptors through a

- cAMP/protein kinase A-dependent mechanism. *Nature*, 348(6298), 239-242. <https://doi.org/10.1038/348239a0>
- Astrup, A., Greenway, F. L., Ling, W., Pedicone, L., Lachowicz, J., Strader, C. D., . . . Group, E. O. S. (2007). Randomized controlled trials of the D1/D5 antagonist ecopipam for weight loss in obese subjects. *Obesity*, 15(7), 1717-1731. <https://doi.org/10.1038/oby.2007.205>
- Bäckman, L., Karlsson, S., Fischer, H., Karlsson, P., Brehmer, Y., Rieckmann, A., . . . Nyberg, L. (2011). Dopamine D1 receptors and age differences in brain activation during working memory. *Neurobiology of aging*, 32(10), 1849-1856. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.10.018>
- Bähring, R., & Covarrubias, M. (2011). Mechanisms of closed-state inactivation in voltage-gated ion channels. *The Journal of Physiology*, 589(3), 461-479. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.191965>
- Basarsky, T. A., Parpura, V., & Haydon, P. G. (1994). Hippocampal synaptogenesis in cell culture: developmental time course of synapse formation, calcium influx, and synaptic protein distribution. *Journal of Neuroscience*, 14(11), 6402-6411. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-11-06402.1994>
- Bazzari, A. H., & Parri, H. R. (2019). Neuromodulators and long-term synaptic plasticity in learning and memory: A steered-glutamatergic perspective. *Brain sciences*, 9(11), 300. <https://doi.org/10.3390/brainsci9110300>
- Beaulieu, J.-M., Borrelli, E., Carlsson, A., Caron, M. G., Civelli, O., Espinoza, S., . . . Keabian, J. W. (2019). Dopamine receptors (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. *IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE*, 2019(4). <https://doi.org/10.2218/gtopdb/F20/2019.4>
- Beaulieu, J. M., Espinoza, S., & Gainetdinov, R. R. (2015). Dopamine receptors— IUPHAR review 13. *British journal of pharmacology*, 172(1), 1-23. <https://doi.org/10.1111/bph.12906>
- Beedle, A. M., McRory, J. E., Poirot, O., Doering, C. J., Altier, C., Barrere, C., . . . Zamponi, G. W. (2004). Agonist-independent modulation of N-type calcium channels by ORL1 receptors. *Nat Neurosci*, 7(2), 118-125. <https://doi.org/10.1038/nn1180>
- Beinborn, M., Ren, Y., Bläker, M., Chen, C., & Kopin, A. S. (2004). Ligand function at constitutively active receptor mutants is affected by two distinct yet interacting mechanisms. *Molecular pharmacology*, 65(3), 753-760. <https://doi.org/10.1124/mol.65.3.753>
- Bender, K. J., Uebele, V. N., Renger, J. J., & Trussell, L. O. (2012). Control of firing patterns through modulation of axon initial segment T-type calcium channels. *The Journal of Physiology*, 590(1), 109-118. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.218768>
- Bender, M., Drago, J., & Rivkees, S. A. (1997). D1 receptors mediate dopamine action in the fetal suprachiasmatic nuclei: studies of mice with targeted deletion of the D1 dopamine receptor gene. *Molecular brain research*, 49(1-2), 271-277. [https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(97\)00161-7](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(97)00161-7)
- Bennett, K. A., Tehan, B., Lebon, G., Tate, C. G., Weir, M., Marshall, F. H., & Langmead, C. J. (2013). Pharmacology and structure of isolated conformations of the adenosine A2A receptor define ligand efficacy. *Molecular pharmacology*, 83(5), 949-958. <https://doi.org/10.1124/mol.112.084509>
- Bergson, C., Mrzljak, L., Smiley, J. F., Pappy, M., Levenson, R., & Goldman-Rakic, P. S. (1995). Regional, cellular, and subcellular variations in the distribution of D1 and

- D5 dopamine receptors in primate brain. *Journal of Neuroscience*, 15(12), 7821-7836. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-12-07821.1995>
- Bernstein, G. M., & Jones, O. T. (2007). Kinetics of internalization and degradation of N-type voltage-gated calcium channels: Role of the $\alpha_2\delta$ subunit. *Cell calcium*, 41(1), 27-40. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2006.04.010>
- Beuckmann, C. T., Sinton, C. M., Miyamoto, N., Ino, M., & Yanagisawa, M. (2003). N-type calcium channel α_1B subunit (CaV2. 2) knock-out mice display hyperactivity and vigilance state differences. *Journal of Neuroscience*, 23(17), 6793-6797. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-17-06793.2003>
- Beyer, D. K., Mattukat, A., & Freund, N. (2021). Prefrontal dopamine D1 receptor manipulation influences anxiety behavior and induces neuroinflammation within the hippocampus. *International Journal of Bipolar Disorders*, 9(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s40345-020-00212-2>
- Bezannilla, F. (2000). The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiological reviews*, 80(2), 555-592. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.2.555>
- Bhatia, A., Moza, S., & Bhalla, U. S. (2019). Precise excitation-inhibition balance controls gain and timing in the hippocampus. *Elife*, 8, e43415. <https://doi.org/10.7554/eLife.43415>
- Bianchi, M. T. (2010). Promiscuous modulation of ion channels by anti-psychotic and anti-dementia medications. *Medical hypotheses*, 74(2), 297-300. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2009.09.003>
- Bicks, L. K., Koike, H., Akbarian, S., & Morishita, H. (2015). Prefrontal cortex and social cognition in mouse and man. *Frontiers in psychology*, 6, 1805. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2015.01805>
- Bittar, T. P., & Labonté, B. (2021). Functional contribution of the medial prefrontal circuitry in major depressive disorder and stress-induced depressive-like behaviors. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 128. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2021.699592>
- Blanchet, P. J., Fang, J., Gillespie, M., Sabounjian, L., Locke, K. W., Gammans, R., . . . Chase, T. N. (1998). Effects of the full dopamine D1 receptor agonist dihydroxidine in Parkinson's disease. *Clinical neuropharmacology*, 21(6), 339-343
- Blazon, M., LaCarubba, B., Bunda, A., Czepiel, N., Mallat, S., Londrigan, L., & Andrade, A. (2021). N-type calcium channels control GABAergic transmission in brain areas related to fear and anxiety. *OBM neurobiology*, 5(1). <https://doi.org/10.21926/obm.neurobiol.2101083>
- Blin, O. (1999). A comparative review of new antipsychotics. *The Canadian Journal of Psychiatry*, 44(3), 235-244. <https://doi.org/10.1177/070674379904400303>
- Blokland, A., Honig, W., & Prickaerts, J. (1998). Effects of haloperidol and d-amphetamine on working and reference memory performance in a spatial cone field task. *Behavioural pharmacology*, 9(5-6), 429-436. <https://doi.org/10.1097/00008877-199809000-00006>
- Blom, H., Rönnlund, D., Scott, L., Spicarova, Z., Rantanen, V., Widengren, J., . . . Brismar, H. (2012). Nearest neighbor analysis of dopamine D1 receptors and Na⁺-K⁺-ATPases in dendritic spines dissected by STED microscopy. *Microscopy research and technique*, 75(2), 220-228. <https://doi.org/10.1002/jemt.21046>

- Bond, R. A., & IJzerman, A. P. (2006). Recent developments in constitutive receptor activity and inverse agonism, and their potential for GPCR drug discovery. *Trends in pharmacological sciences*, 27(2), 92-96. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.12.007>
- Borroto-Escuela, D. O., & Fuxe, K. (2017). Diversity and bias through dopamine D2R heteroreceptor complexes. *Current Opinion in Pharmacology*, 32, 16-22. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2016.10.004>
- Bourne, J. A. (2001). SCH 23390: the first selective dopamine D1-like receptor antagonist. *CNS drug reviews*, 7(4), 399-414. <https://doi.org/10.1111/j.1527-3458.2001.tb00207.x>
- Boyd-Kimball, D., Gonczy, K., Lewis, B., Mason, T., Siliko, N., & Wolfe, J. (2018). Classics in chemical neuroscience: chlorpromazine. *ACS chemical neuroscience*, 10(1), 79-88. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.8b00258>
- Braun, U., Harneit, A., Pergola, G., Menara, T., Schäfer, A., Betzel, R. F., . . . Schwarz, K. (2021). Brain network dynamics during working memory are modulated by dopamine and diminished in schizophrenia. *Nature communications*, 12(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23694-9>
- Buchta, W. C., Moutal, A., Hines, B., Garcia-Keller, C., Smith, A. C., Kalivas, P., . . . Riegel, A. C. (2020). Dynamic CRMP2 regulation of CaV2. 2 in the prefrontal cortex contributes to the reinstatement of cocaine seeking. *Molecular neurobiology*, 57(1), 346-357. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-01711-9>
- Bunda, A., LaCarubba, B., Bertolino, M., Akiki, M., Bath, K., Lopez-Soto, J., . . . Andrade, A. (2019). Cacna1b alternative splicing impacts excitatory neurotransmission and is linked to behavioral responses to aversive stimuli. *Molecular brain*, 12(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s13041-019-0500-1>
- Busnelli, M., Mauri, M., Parenti, M., & Chini, B. (2013). Analysis of GPCR dimerization using acceptor photobleaching resonance energy transfer techniques *Methods in Enzymology* (Vol. 521, pp. 311-327): Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391862-8.00017-X>
- Cabrera-Vera, T. M., Vanhauwe, J., Thomas, T. O., Medkova, M., Preininger, A., Mazzoni, M. R., & Hamm, H. E. (2003). Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocrine reviews*, 24(6), 765-781. <https://doi.org/10.1210/er.2000-0026>
- Cai, G., Gurdal, H., Smith, C., Wang, H.-Y., & Friedman, E. (1999). Inverse Agonist Properties of Dopaminergic Antagonists at the D1A Dopamine Receptor: Uncoupling of the D1ADopamine Receptor from Gs Protein. *Molecular pharmacology*, 56(5), 989-996. <https://doi.org/10.1124/mol.56.5.989>
- Cain, S. M., & Snutch, T. P. (2011). Voltage-gated calcium channels and disease. *Biofactors*, 37(3), 197-205. <https://doi.org/10.1002/biof.158>
- Carlén, M. (2017). What constitutes the prefrontal cortex? *Science*, 358(6362), 478-482. <https://doi.org/10.1126/science.aan8868>
- Carozzo, A., Yaneff, A., Gómez, N., Di Siervi, N., Sahores, A., Diez, F., . . . Davio, C. (2019). Identification of MRP4/ABCC4 as a Target for Reducing the Proliferation of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells by Modulating the cAMP Efflux. *Molecular pharmacology*, 96(1), 13-25. <https://doi.org/10.1124/mol.118.115444>
- Casadó-Anguera, V., Cortés, A., Casadó, V., & Moreno, E. (2019). Targeting the receptor-based interactome of the dopamine D1 receptor: looking for heteromer-selective drugs. *Expert opinion on drug discovery*, 14(12), 1297-1312. <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1664469>

- Castiglioni, A. J., Raingo, J., & Lipscombe, D. (2006). Alternative splicing in the C-terminus of CaV2. 2 controls expression and gating of N-type calcium channels. *The Journal of Physiology*, *576*(1), 119-134. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.115030>
- Catterall, W. A. (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annual review of cell and developmental biology*, *16*(1), 521-555. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.16.1.521>
- Catterall, W. A. (2011). Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *3*(8), a003947. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003947>
- Cauler, L. J., & Connors, B. W. (1994). Synaptic physiology of horizontal afferents to layer I in slices of rat SI neocortex. *Journal of Neuroscience*, *14*(2), 751-762. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-02-00751.1994>
- Cohen, S. N., & Chang, A. C. (1974). A method for selective cloning of eukaryotic DNA fragments in *Escherichia coli* by repeated transformation. *Molecular and General Genetics MGG*, *134*(2), 133-141. <https://doi.org/10.1007/BF00268415>
- Coppola, T., Waldmann, R., Borsotto, M., Heurteaux, C., Romey, G., Mattéi, M.-G., & Lazdunski, M. (1994). Molecular cloning of a murine N-type calcium channel α 1 subunit: Evidence for isoforms, brain distribution, and chromosomal localization. *FEBS letters*, *338*(1), 1-5. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)80105-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)80105-3)
- Cordisco Gonzalez, S., Mustafa, E. R., Rodriguez, S. S., Perello, M., & Raingo, J. (2020). Dopamine Receptor Type 2 and Ghrelin Receptor Coexpression Alters CaV2.2 Modulation by G Protein Signaling Cascades. *ACS Chem Neurosci*, *11*(1), 3-13. <https://doi.org/10.1021/acchemneuro.9b00426>
- Cornejo, M. P., Mustafá, E. R., Barrile, F., Cassano, D., De Francesco, P. N., Raingo, J., & Perello, M. (2021). The intriguing ligand-dependent and ligand-independent actions of the growth hormone secretagogue receptor on reward-related behaviors. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *120*, 401-416. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.10.017>
- Costa, T., & Cotecchia, S. (2005). Historical review: negative efficacy and the constitutive activity of G-protein-coupled receptors. *Trends in pharmacological sciences*, *26*(12), 618-624. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.10.009>
- Costa, T., & Herz, A. (1989). Antagonists with negative intrinsic activity at delta opioid receptors coupled to GTP-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *86*(19), 7321-7325. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.19.7321>
- Crunkhorn, S. (2021). Understanding dopamine receptor signalling. *Nature Reviews Drug Discovery*, *20*(3), 178-179. <https://doi.org/10.1038/d41573-021-00027-5>
- Curran, J., & Mohler, P. J. (2015). Alternative paradigms for ion channelopathies: disorders of ion channel membrane trafficking and posttranslational modification. *Annual review of physiology*, *77*, 505-524. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021014-071838>
- Currie, K. P. (2010). G protein inhibition of CaV2 calcium channels. *Channels*, *4*(6), 497-509. <https://doi.org/10.4161/chan.4.6.12871>
- Chalmers, D. T., & Behan, D. P. (2002). The use of constitutively active GPCRs in drug discovery and functional genomics. *Nature Reviews Drug Discovery*, *1*(8), 599-608. <https://doi.org/10.1038/nrd872>

- Charpentier, S., Jarvie, K. R., Severynse, D. M., Caron, M. G., & Tiberi, M. (1996). Silencing of the Constitutive Activity of the Dopamine D1B Receptor *Journal of Biological Chemistry*, 271(45), 28071-28076. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.45.28071>
- Chemin, J., Monteil, A., Perez-Reyes, E., Bourinet, E., Nargeot, J., & Lory, P. (2002). Specific contribution of human T-type calcium channel isoforms ($\alpha 1G$, $\alpha 1H$ and $\alpha 1I$) to neuronal excitability. *The Journal of Physiology*, 540(1), 3-14. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2001.013269>
- Chen, L., Bohanick, J., Nishihara, M., Seamans, J., & Yang, C. R. (2007). Dopamine D1/5 receptor-mediated LTP of intrinsic excitability in rat prefrontal cortical neurons: Ca^{2+} -dependent intracellular signaling. *Journal of neurophysiology*. <https://doi.org/10.1152/jn.00317.2006>
- Chetrit, J., Taupignon, A., Froux, L., Morin, S., Bouali-Benazzouz, R., Naudet, F., . . . Benazzouz, A. (2013). Inhibiting subthalamic D5 receptor constitutive activity alleviates abnormal electrical activity and reverses motor impairment in a rat model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience*, 33(37), 14840-14849. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0453-13.2013>
- Chien, E. Y., Liu, W., Zhao, Q., Katritch, V., Won Han, G., Hanson, M. A., . . . Cherezov, V. (2010). Structure of the human dopamine D3 receptor in complex with a D2/D3 selective antagonist. *Science*, 330(6007), 1091-1095. <https://doi.org/10.1126/science.1197410>
- Chocyk, A., Czyrak, A., & Wedzony, K. (2008). Dopamine D1-like receptors agonist SKF 38393 increases cFOS expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus--impact of acute and chronic cocaine. *Journal of Physiology and Pharmacology: an Official Journal of the Polish Physiological Society*, 59(3), 425-440
- D'Aoust, J.-P., & Tiberi, M. (2010). Role of the extracellular amino terminus and first membrane-spanning helix of dopamine D1 and D5 receptors in shaping ligand selectivity and efficacy. *Cellular signalling*, 22(1), 106-116. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.09.020>
- Damian, M., Louet, M., Gomes, A. A. S., M'kadmi, C., Denoyelle, S., Cantel, S., . . . Catoire, L. J. (2021). Allosteric modulation of ghrelin receptor signaling by lipids. *Nature communications*, 12(1), 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23756-y>
- Datta, D., Mentone, S., Morozov, Y., & Arnsten, A. (2021). Subcellular Localization of Schizophrenia Risk Genes Encoding Cav1. 2 (CACNA1C) and VIPR2 in Rhesus Macaque Dorsolateral Prefrontal Cortex. *Biological psychiatry*, 89(9), S308. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2021.02.768>
- Davio, C. A., Cricco, G. P., Bergoc, R. M., & Rivera, E. S. (1995). H1 and H2 histamine receptors in N-nitroso-N-methylurea (NMU)-induced carcinomas with atypical coupling to signal transducers. *Biochem Pharmacol*, 50(1), 91-96. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(95\)00108-c](https://doi.org/10.1016/0006-2952(95)00108-c)
- De Keyser, J., De Backer, J.-P., Vauquelin, G., & Ebinger, G. (1990). The effect of aging on the D1 dopamine receptors in human frontal cortex. *Brain Research*, 528(2), 308-310. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)91672-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91672-4)
- Del'Guidice, T., Lemasson, M., & Beaulieu, J.-M. (2011). Role of beta-arrestin 2 downstream of dopamine receptors in the basal ganglia. *Frontiers in neuroanatomy*, 5, 58. <https://doi.org/10.3389/fnana.2011.00058>

- Dembrow, N., & Johnston, D. (2014). Subcircuit-specific neuromodulation in the prefrontal cortex. *Frontiers in neural circuits*, 8, 54. <https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00054>
- Den Boon, F. S., Werkman, T. R., Schaafsma-Zhao, Q., Houthuijs, K., Vitalis, T., Kruse, C. G., . . . Chameau, P. (2015). Activation of type-1 cannabinoid receptor shifts the balance between excitation and inhibition towards excitation in layer II/III pyramidal neurons of the rat prelimbic cortex. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 467(7), 1551-1564. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1586-z>
- Desai, A., Benner, L., Wu, R., Gertsik, L., Maruff, P., Light, G. A., . . . Zhu, T. (2021). Phase 1 randomized study on the safety, tolerability, and pharmacodynamic cognitive and electrophysiological effects of a dopamine D1 receptor positive allosteric modulator in patients with schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 46(6), 1145-1151. <https://doi.org/10.1038/s41386-020-00908-0>
- Diaz, A., & Dickenson, A. H. (1997). Blockade of spinal N- and P-type, but not L-type, calcium channels inhibits the excitability of rat dorsal horn neurones produced by subcutaneous formalin inflammation. *Pain*, 69(1-2), 93-100. [https://doi.org/10.1016/s0304-3959\(96\)03271-x](https://doi.org/10.1016/s0304-3959(96)03271-x)
- Diaz Heijtz, R., Scott, L., & Forsberg, 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. *European Journal of Neuroscience*, 19(4), 945-956. <https://doi.org/10.1111/j.0953-816x.2004.03154.x>
- Doering, C. J., Peloquin, J. B., & McRory, J. E. (2007). The Cav1.4 calcium channel: more than meets the eye. *Channels*, 1(1), 4-11
- Dolmetsch, R. E., Pajvani, U., Fife, K., Spotts, J. M., & Greenberg, M. E. (2001). Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway. *Science*, 294(5541), 333-339. <https://doi.org/10.1126/science.1063395>
- Dolphin, A. C. (2006). A short history of voltage-gated calcium channels. *British journal of pharmacology*, 147(S1). <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706442>
- Dolphin, A. C. (2012). Calcium channel auxiliary $\alpha_2\delta$ and β subunits: trafficking and one step beyond. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(8), 542-555. <https://doi.org/10.1038/nrn3311>
- Dolphin, A. C. (2016). Voltage-gated calcium channels and their auxiliary subunits: physiology and pathophysiology and pharmacology. *The Journal of Physiology*, 594(19), 5369-5390. <https://doi.org/10.1113/JP272262>
- Dolphin, A. C., & Lee, A. (2020). Presynaptic calcium channels: specialized control of synaptic neurotransmitter release. *Nature Reviews Neuroscience*, 21(4), 213-229. <https://doi.org/10.1038/s41583-020-0278-2>
- Douglas, R. J., & Martin, K. A. (2004). Neuronal circuits of the neocortex. *Annual review of neuroscience*, 27(1), 419-451. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144152>
- Drolet, P., Bilodeau, L., Chorvatova, A., Laflamme, L., Gallo-Payet, N., & Payet, M. D. (1997). Inhibition of the T-type Ca^{2+} current by the dopamine D1 receptor in rat adrenal glomerulosa cells: requirement of the combined action of the $\text{G}\beta\gamma$ protein subunit and cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate. *Molecular Endocrinology*, 11(4), 503-514. <https://doi.org/10.1210/mend.11.4.9910>
- Dubel, S. J., Starr, T., Hell, J., Ahljanian, M. K., Enyeart, J. J., Catterall, W. A., & Snutch, T. P. (1992). Molecular cloning of the alpha-1 subunit of an omega-conotoxin-

- sensitive calcium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(11), 5058-5062. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.11.5058>
- Dubovsky, S. L. (2019). Applications of calcium channel blockers in psychiatry: pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects of treatment of bipolar disorder. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 15(1), 35-47. <https://doi.org/10.1080/17425255.2019.1558206>
- Fan, L., Tan, L., Chen, Z., Qi, J., Nie, F., Luo, Z., . . . Wang, S. (2020). Haloperidol bound D2 dopamine receptor structure inspired the discovery of subtype selective ligands. *Nature communications*, 11(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14884-y>
- Farnbach-Pralong, D., Bradbury, R., Copolov, D., & Dean, B. (1998). Clozapine and olanzapine treatment decreases rat cortical and limbic GABAA receptors. *European journal of pharmacology*, 349(2-3), R7-R8. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(98\)00285-4](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(98)00285-4)
- Faron-Górecka, A., Szlachta, M., Kolasa, M., Solich, J., Górecki, A., Kuśmider, M., . . . Dziedzicka-Wasylewska, M. (2019). Understanding GPCR dimerization *Methods in Cell Biology* (Vol. 149, pp. 155-178): Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2018.08.005>
- Fazio, L., Pergola, G., Papalino, M., Di Carlo, P., Monda, A., Gelao, B., . . . Popolizio, T. (2018). Transcriptomic context of DRD1 is associated with prefrontal activity and behavior during working memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(21), 5582-5587. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717135115>
- Fekete, A., Johnston, J., & Delaney, K. R. (2014). Presynaptic T-type Ca²⁺ channels modulate dendrodendritic mitral–mitral and mitral–periglomerular connections in mouse olfactory bulb. *Journal of Neuroscience*, 34(42), 14032-14045. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0905-14.2014>
- Felippe, R. M., Oliveira, G. M., Barbosa, R. S., Esteves, B. D., Gonzaga, B., Horita, S. I., . . . Frago, V. (2021). Experimental social stress: Dopaminergic receptors, oxidative stress, and c-Fos protein are involved in highly aggressive behavior. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 324. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.696834>
- Fell, B., Eckrich, S., Blum, K., Eckrich, T., Hecker, D., Obermair, G. J., . . . Engel, J. (2016). $\alpha 2\delta 2$ controls the function and trans-synaptic coupling of Cav1.3 channels in mouse inner hair cells and is essential for normal hearing. *Journal of Neuroscience*, 36(43), 11024-11036. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3468-14.2016>
- Ferguson, S. S., Zhang, J., Barakt, L. S., & Caron, M. G. (1998). Molecular mechanisms of G protein-coupled receptor desensitization and resensitization. *Life sciences*, 62(17-18), 1561-1565. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(98\)00107-6](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(98)00107-6)
- Flavell, S. W., & Greenberg, M. E. (2008). Signaling Mechanisms Linking Neuronal Activity to Gene Expression and Plasticity of the Nervous System. *Annual review of neuroscience*, 31(1), 563-590. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.060407.125631>
- Franco, R., Casado, V., Mallol, J., Ferrada, C., Ferre, S., Fuxe, K., . . . Canela, E. I. (2006). The two-state dimer receptor model: a general model for receptor dimers. *Molecular pharmacology*, 69(6), 1905-1912. <https://doi.org/10.1124/mol.105.020685>
- Fujita, Y., Mynlieff, M., Dirksen, R. T., Kim, M.-S., Niidome, T., Nakai, J., . . . Furuichi, T. (1993). Primary structure and functional expression of the ω -conotoxin-sensitive

- N-type calcium channel from rabbit brain. *Neuron*, 10(4), 585-598. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90162-k](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90162-k)
- Fuster, J. M. (2001). The prefrontal cortex—an update: time is of the essence. *Neuron*, 30(2), 319-333. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00285-9](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00285-9)
- Gao, P. P., Graham, J. W., Zhou, W.-L., Jang, J., Angulo, S., Dura-Bernal, S., . . . Antic, S. D. (2021). Local glutamate-mediated dendritic plateau potentials change the state of the cortical pyramidal neuron. *Journal of neurophysiology*, 125(12), 23-42. <https://doi.org/10.1152/jn.00734.2019>
- Gao, R., & Penzes, P. (2015). Common mechanisms of excitatory and inhibitory imbalance in schizophrenia and autism spectrum disorders. *Current molecular medicine*, 15(2), 146-167. <https://doi.org/10.2174/1566524015666150303003028>
- Garza-Lopez, E., Lopez, J. A., Hagen, J., Sheffer, R., Meiner, V., & Lee, A. (2018). Role of a conserved glutamine in the function of voltage-gated Ca(2+) channels revealed by a mutation in human CACNA1D. *J Biol Chem*, 293(37), 14444-14454. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003681>
- Gass, J., & Chandler, L. (2013). The plasticity of extinction: contribution of the prefrontal cortex in treating addiction through inhibitory learning. *Frontiers in psychiatry*, 4, 46. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2013.00046>
- Gemperle, A., Enz, A., Pozza, M., Lthi, A., & Olpe, H. (2003). Effects of clozapine, haloperidol and iloperidone on neurotransmission and synaptic plasticity in prefrontal cortex and their accumulation in brain tissue: an in vitro study. *Neuroscience*, 117(3), 681-695. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(02\)00769-8](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(02)00769-8)
- Gemperle, A., & Olpe, H.-R. (2004). Effects of subchronic clozapine treatment on long-term potentiation in rat prefrontal cortex. *European Neuropsychopharmacology*, 14(4), 340-346. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2003.10.006>
- Glickstein, S. B., & Schmauss, C. (2001). Dopamine receptor functions: lessons from knockout mice. *Pharmacology & therapeutics*, 91(1), 63-83. [https://doi.org/10.1016/s0163-7258\(01\)00145-0](https://doi.org/10.1016/s0163-7258(01)00145-0)
- Glovaci, I., Caruana, D., & Chapman, C. (2014). Dopaminergic enhancement of excitatory synaptic transmission in layer II entorhinal neurons is dependent on D1-like receptor-mediated signaling. *Neuroscience*, 258, 74-83. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.10.076>
- Gonzalez-Islas, C., & Hablitz, J. J. (2003). Dopamine enhances EPSCs in layer II–III pyramidal neurons in rat prefrontal cortex. *Journal of Neuroscience*, 23(3), 867-875. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-03-00867.2003>
- Goto, Y., Yang, C. R., & Otani, S. (2010). Functional and dysfunctional synaptic plasticity in prefrontal cortex: roles in psychiatric disorders. *Biological psychiatry*, 67(3), 199-207. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.08.026>
- Goutier, W., O'Connor, J., Lowry, J. P., & McCreary, A. C. (2015). The effect of nicotine induced behavioral sensitization on dopamine D1 receptor pharmacology: an in vivo and ex vivo study in the rat. *European Neuropsychopharmacology*, 25(6), 933-943. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2015.02.008>
- Green, S. M., Nathani, S., Zimmerman, J., Fireman, D., & Urs, N. M. (2020). Retrograde Labeling Illuminates Distinct Topographical Organization of D1 and D2 Receptor-Positive Pyramidal Neurons in the Prefrontal Cortex of Mice. *Eneuro*, 7(5). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0194-20.2020>

- Gregory, F. D., Pangršič, T., Calin-Jageman, I. E., Moser, T., & Lee, A. (2013). Harmonin enhances voltage-dependent facilitation of Cav1.3 channels and synchronous exocytosis in mouse inner hair cells. *The Journal of Physiology*, *591*(13), 3253-3269. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.254367>
- Guitart, X., Moreno, E., Rea, W., Sánchez-Soto, M., Cai, N.-S., Quiroz, C., . . . Canela, E. I. (2019). Biased G protein-independent signaling of dopamine D1-D3 receptor heteromers in the nucleus accumbens. *Molecular neurobiology*, *56*(10), 6756-6769. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1564-8>
- Gundersen, E. T., Førde, J.-L., Tislevoll, B. S., Leitch, C., Barratt, G., Gjertsen, B. T., & Herfindal, L. (2022). Repurposing chlorpromazine for anti-leukaemic therapy by nanoparticle encapsulation. *International journal of pharmaceutics*, *612*, 121296. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121296>
- Guo, S., Cosky, E., Li, F., Guan, L., Ji, Y., Wei, W., . . . Ding, Y. (2021). An inhibitory and beneficial effect of chlorpromazine and promethazine (C+ P) on hyperglycolysis through HIF-1 α regulation in ischemic stroke. *Brain Research*, *1763*, 147463. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2021.147463>
- Gurden, H., Takita, M., & Jay, T. M. (2000). Essential role of D1 but not D2 receptors in the NMDA receptor-dependent long-term potentiation at hippocampal-prefrontal cortex synapses in vivo. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, *20*(22), RC106-RC106. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-22-j0003.2000>
- Gurevich, V. V., & Gurevich, E. V. (2008). GPCR monomers and oligomers: it takes all kinds. *Trends in Neurosciences*, *31*(2), 74-81. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.11.007>
- Hall, A., Provins, L., & Valade, A. (2018). Novel strategies to activate the dopamine D1 receptor: recent advances in orthosteric agonism and positive allosteric modulation. *Journal of medicinal chemistry*, *62*(1), 128-140. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01767>
- Hall, H., Sedvall, G., Magnusson, O., Kopp, J., Halldin, C., & Farde, L. (1994). Distribution of D1- and D2-dopamine receptors, and dopamine and its metabolites in the human brain. *Neuropsychopharmacology*, *11*(4), 245-256. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1380111>
- Hamilton, T. J., Wheatley, B. M., Sinclair, D. B., Bachmann, M., Larkum, M. E., & Colmers, W. F. (2010). Dopamine modulates synaptic plasticity in dendrites of rat and human dentate granule cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(42), 18185-18190. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011558107>
- Haney, M., Ward, A. S., Foltin, R. W., & Fischman, M. W. (2001). Effects of ecopipam, a selective dopamine D1 antagonist, on smoked cocaine self-administration by humans. *Psychopharmacology*, *155*(4), 330-337. <https://doi.org/10.1007/s002130100725>
- Hasbi, A., Perreault, M. L., Shen, M. Y., Zhang, L., To, R., Fan, T., . . . George, S. R. (2014). A peptide targeting an interaction interface disrupts the dopamine D1-D2 receptor heteromer to block signaling and function in vitro and in vivo: effective selective antagonism. *The FASEB Journal*, *28*(11), 4806-4820. <https://doi.org/10.1096/fj.14-254037>
- Hazelwood, L. A., Free, R. B., Cabrera, D. M., Skinbjerg, M., & Sibley, D. R. (2008). Reciprocal modulation of function between the D1 and D2 dopamine receptors and the Na⁺, K⁺-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(52), 36441-36453. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805520200>

- He, H.-y., & Cline, H. T. (2019). What is excitation/inhibition and how is it regulated? A case of the elephant and the wisemen. *Journal of Experimental Neuroscience*, *13*, 1179069519859371. <https://doi.org/10.1177/1179069519859371>
- Heinke, B., Balzer, E., & Sandkühler, J. (2004). Pre- and postsynaptic contributions of voltage-dependent Ca²⁺ channels to nociceptive transmission in rat spinal lamina I neurons. *European Journal of Neuroscience*, *19*(1), 103-111. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.03083.x>
- Heng, L.-J., Markham, J. A., Hu, X.-T., & Tseng, K. Y. (2011). Concurrent upregulation of postsynaptic L-type Ca²⁺ channel function and protein kinase A signaling is required for the periadolescent facilitation of Ca²⁺ plateau potentials and dopamine D1 receptor modulation in the prefrontal cortex. *Neuropharmacology*, *60*(6), 953-962. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.01.041>
- Hernández-López, S., Bargas, J., Surmeier, D. J., Reyes, A., & Galarraga, E. (1997). D1 receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type Ca²⁺ conductance. *Journal of Neuroscience*, *17*(9), 3334-3342. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-09-03334.1997>
- Hernández-López, S., Tkatch, T., Perez-Garci, E., Galarraga, E., Bargas, J., Hamm, H., & Surmeier, D. J. (2000). D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca²⁺ currents and excitability via a novel PLCβ1-IP3-calcineurin-signaling cascade. *Journal of Neuroscience*, *20*(24), 8987-8995. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-24-08987.2000>
- Herold, C., Joshi, I., Chehadi, O., Hollmann, M., & Güntürkün, O. (2012). Plasticity in D1-like receptor expression is associated with different components of cognitive processes. *PloS one*, *7*(5), e36484. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036484>
- Higley, M. J., & Sabatini, B. L. (2012). Calcium signaling in dendritic spines. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *4*(4), a005686. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005686>
- Holmes, A., Lachowicz, J. E., & Sibley, D. R. (2004). Phenotypic analysis of dopamine receptor knockout mice; recent insights into the functional specificity of dopamine receptor subtypes. *Neuropharmacology*, *47*(8), 1117-1134. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.07.034>
- Hou, Y., Wu, C. F., Yang, J. Y., & Guo, T. (2006). Differential effects of haloperidol, clozapine and olanzapine on learning and memory functions in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *30*(8), 1486-1495. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2006.06.001>
- Hoyer, D., & Boddeke, H. W. (1993). Partial agonists, full agonists, antagonists: dilemmas of definition. *Trends in pharmacological sciences*, *14*(7), 270-275. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(93\)90129-8](https://doi.org/10.1016/0165-6147(93)90129-8)
- Hu, W., & Bean, B. P. (2018). Differential control of axonal and somatic resting potential by voltage-dependent conductances in cortical layer 5 pyramidal neurons. *Neuron*, *97*(6), 1315-1326. e1313. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.02.016>
- Huang, J., & Zamponi, G. W. (2017). Regulation of voltage gated calcium channels by GPCRs and post-translational modification. *Current Opinion in Pharmacology*, *32*, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2016.10.001>
- Huang, Y.-Y., Simpson, E., Kellendonk, C., & Kandel, E. R. (2004). Genetic evidence for the bidirectional modulation of synaptic plasticity in the prefrontal cortex by D1 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(9), 3236-3241. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308280101>

- Huang, Z., Lujan, R., Kadurin, I., Uebele, V. N., Renger, J. J., Dolphin, A. C., & Shah, M. M. (2011). Presynaptic HCN1 channels regulate Cav3. 2 activity and neurotransmission at select cortical synapses. *Nature neuroscience*, *14*(4), 478-486. <https://doi.org/10.1038/nn.2757>
- Huganir, R. L., & Nicoll, R. A. (2013). AMPARs and synaptic plasticity: the last 25 years. *Neuron*, *80*(3), 704-717. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.025>
- Huguenard, J. R., Hamill, O. P., & Prince, D. A. (1989). Sodium channels in dendrites of rat cortical pyramidal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *86*(7), 2473-2477. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.7.2473>
- Iiri, T., Bell, S. M., Baranski, T. J., Fujita, T., & Bourne, H. R. (1999). A G α mutant designed to inhibit receptor signaling through Gs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(2), 499-504. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.2.499>
- Inoue, A., Raimondi, F., Kadji, F. M. N., Singh, G., Kishi, T., Uwamizu, A., . . . Arang, N. (2019). Illuminating G-protein-coupling selectivity of GPCRs. *Cell*, *177*(7), 1933-1947. e1925. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.04.044>
- Ito, K., Nakazawa, K., Koizumi, S., Liu, M., Takeuchi, K., Hashimoto, T., . . . Inoue, K. (1996). Inhibition by antipsychotic drugs of L-type Ca $^{2+}$ channel current in PC12 cells. *European journal of pharmacology*, *314*(1-2), 143-150. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(96\)00500-6](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(96)00500-6)
- Jablonka, S., Beck, M., Lechner, B. D., Mayer, C., & Sendtner, M. (2007). Defective Ca $^{2+}$ channel clustering in axon terminals disturbs excitability in motoneurons in spinal muscular atrophy. *The Journal of cell biology*, *179*(1), 139-149. <https://doi.org/10.1083/jcb.200703187>
- Jacus, M. O., Uebele, V. N., Renger, J. J., & Todorovic, S. M. (2012). Presynaptic Cav3. 2 channels regulate excitatory neurotransmission in nociceptive dorsal horn neurons. *Journal of Neuroscience*, *32*(27), 9374-9382. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0068-12.2012>
- Jiang, L., O'Leary, C., Kim, H. A., Parish, C. L., Massalas, J., Waddington, J. L., . . . Lawrence, A. J. (2015). Motor and behavioral phenotype in conditional mutants with targeted ablation of cortical D1 dopamine receptor-expressing cells. *Neurobiology of Disease*, *76*, 137-158. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.02.006>
- Jones-Tabah, J., Mohammad, H., Paulus, E. G., Clarke, P. B., & Hébert, T. E. (2021). The Signaling and Pharmacology of the Dopamine D1 Receptor. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *15*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.806618>
- Jones, L. P., DeMaria, C. D., & Yue, D. T. (1999). N-type calcium channel inactivation probed by gating-current analysis. *Biophysical journal*, *76*(5), 2530-2552. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77407-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77407-2)
- Jones, M. (2002). A comparative review of rodent prefrontal cortex and working memory. *Current molecular medicine*, *2*(7), 639-647. <https://doi.org/10.2174/1566524023361989>
- Kabir, Z. D., Martínez-Rivera, A., & Rajadhyaksha, A. M. (2017). From gene to behavior: L-type calcium channel mechanisms underlying neuropsychiatric symptoms. *Neurotherapeutics*, *14*(3), 588-613. <https://doi.org/10.1007/s13311-017-0532-0>
- Kammermeier, P. J. (2015). Constitutive activity of metabotropic glutamate receptor 7. *BMC neuroscience*, *16*(1), 1-7. <https://doi.org/10.1186/s12868-015-0154-6>
- Kasai, R. S., & Kusumi, A. (2014). Single-molecule imaging revealed dynamic GPCR dimerization. *Current opinion in cell biology*, *27*(Supplement C), 78-86. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2013.11.008>

- Kass, R. S. (2005). The channelopathies: novel insights into molecular and genetic mechanisms of human disease. *The Journal of clinical investigation*, *115*(8), 1986-1989. <https://doi.org/10.1172/JCI26011>
- Kavalali, E. T. (2015). The mechanisms and functions of spontaneous neurotransmitter release. *Nature Reviews Neuroscience*, *16*(1), 5-16. <https://doi.org/10.1038/nrn3875>
- Kawaguchi, Y., & Kubota, Y. (1997). GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cerebral cortex (New York, NY: 1991)*, *7*(6), 476-486. <https://doi.org/10.1093/cercor/7.6.476>
- Keeler, B. E., Lallemand, P., Patel, M. M., de Castro Brás, L. E., & Clemens, S. (2016). Opposing aging-related shift of excitatory dopamine D1 and inhibitory D3 receptor protein expression in striatum and spinal cord. *Journal of neurophysiology*, *115*(1), 363-369. <https://doi.org/10.1152/jn.00390.2015>
- Kenakin, T. (2004). Efficacy as a vector: the relative prevalence and paucity of inverse agonism. *Molecular pharmacology*, *65*(1), 2-11. <https://doi.org/10.1124/mol.65.1.2>
- Kenakin, T. P. (2012). Biased signalling and allosteric machines: new vistas and challenges for drug discovery. *British journal of pharmacology*, *165*(6), 1659-1669. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01749.x>
- Kennedy, M. B. (2000). Signal-processing machines at the postsynaptic density. *Science*, *290*(5492), 750-754. <https://doi.org/10.1126/science.290.5492.750>
- Khakhalin, A. S., Koren, D., Gu, J., Xu, H., & Aizenman, C. D. (2014). Excitation and inhibition in recurrent networks mediate collision avoidance in *Xenopus* tadpoles. *European Journal of Neuroscience*, *40*(6), 2948-2962. <https://doi.org/10.1111/ejn.12664>
- Khasnavis, T., Torres, R. J., Sommerfeld, B., Puig, J. G., Chipkin, R., & Jinnah, H. (2016). A double-blind, placebo-controlled, crossover trial of the selective dopamine D1 receptor antagonist ecopipam in patients with Lesch-Nyhan disease. *Molecular genetics and metabolism*, *118*(3), 160-166. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2016.04.012>
- Kim, C., Jeon, D., Kim, Y.-H., Lee, C. J., Kim, H., & Shin, H.-S. (2009). Deletion of N-type Ca²⁺ channel Cav2.2 results in hyperaggressive behaviors in mice. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(5), 2738-2745. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807179200>
- Kintz, N., Petzinger, G. M., & Jakowec, M. W. (2017). Treadmill exercise modifies dopamine receptor expression in the prefrontal cortex of the 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-lesioned mouse model of Parkinson's disease. *Neuroreport*, *28*(15), 987-995. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000000865>
- Kisilevsky, A. E., Mulligan, S. J., Altier, C., Iftinca, M. C., Varela, D., Tai, C., . . . Zamponi, G. W. (2008). D1 receptors physically interact with N-type calcium channels to regulate channel distribution and dendritic calcium entry. *Neuron*, *58*(4), 557-570. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.03.002>
- Kisilevsky, A. E., & Zamponi, G. W. (2008a). D2 dopamine receptors interact directly with N-type calcium channels and regulate channel surface expression levels. *Channels*, *2*(4), 269-277. <https://doi.org/10.4161/chan.2.4.6402>
- Kisilevsky, A. E., & Zamponi, G. W. (2008b). Presynaptic calcium channels: structure, regulators, and blockers. *Handb Exp Pharmacol*(184), 45-75. https://doi.org/10.1007/978-3-540-74805-2_3

- Klarenbeek, J. B., Goedhart, J., Hink, M. A., Gadella, T. W., & Jalink, K. (2011). A mTurquoise-based cAMP sensor for both FLIM and ratiometric read-out has improved dynamic range. *PloS one*, *6*(4), e19170. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019170>
- Klein, M. O., Battagello, D. S., Cardoso, A. R., Hauser, D. N., Bittencourt, J. C., & Correa, R. G. (2019). Dopamine: functions, signaling, and association with neurological diseases. *Cellular and molecular neurobiology*, *39*(1), 31-59. <https://doi.org/10.1007/s10571-018-0632-3>
- Ko, I.-G., Kim, C.-J., & Kim, H. (2019). Treadmill exercise improves memory by up-regulating dopamine and down-regulating D2 dopamine receptor in traumatic brain injury rats. *Journal of exercise rehabilitation*, *15*(4), 504. <https://doi.org/10.12965/jer.1938316.158>
- Ko, J. (2017). Neuroanatomical substrates of rodent social behavior: the medial prefrontal cortex and its projection patterns. *Frontiers in neural circuits*, *11*, 41. <https://doi.org/10.3389/fncir.2017.00041>
- Koizumi, H., Hiraga, T., Oharomari, L. K., Hata, T., Shima, T., Yook, J. S., . . . Soya, H. (2021). Preventive role of regular low-intensity exercise during adolescence in schizophrenia model mice with abnormal behaviors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *534*, 610-616. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.11.032>
- Kolata, S., Light, K., Wass, C. D., Colas-Zelin, D., Roy, D., & Matzel, L. D. (2010). A dopaminergic gene cluster in the prefrontal cortex predicts performance indicative of general intelligence in genetically heterogeneous mice. *PloS one*, *5*(11), e14036. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014036>
- Kong, M. M., Fan, T., Varghese, G., O'dowd, B. F., & George, S. R. (2006). Agonist-induced cell surface trafficking of an intracellularly sequestered D1 dopamine receptor homo-oligomer. *Molecular pharmacology*, *70*(1), 78-89. <https://doi.org/10.1124/mol.105.021246>
- Koski, G., Streaty, R., & Klee, W. (1982). Modulation of sodium-sensitive GTPase by partial opiate agonists. An explanation for the dual requirement for Na⁺ and GTP in inhibitory regulation of adenylate cyclase. *Journal of Biological Chemistry*, *257*(23), 14035-14040
- Kostylev, M., Otwell, A. E., Richardson, R. E., & Suzuki, Y. (2015). Cloning should be simple: Escherichia coli DH5 α -mediated assembly of multiple DNA fragments with short end homologies. *PloS one*, *10*(9), e0137466. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137466>
- Ladepêche, L., Dupuis, J. P., Bouchet, D., Doudnikoff, E., Yang, L., Campagne, Y., . . . Groc, L. (2013). Single-molecule imaging of the functional crosstalk between surface NMDA and dopamine D1 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(44), 18005-18010. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310145110>
- Lally, J., & MacCabe, J. H. (2015). Antipsychotic medication in schizophrenia: a review. *British medical bulletin*, *114*(1), 169-179. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldv017>
- Larkum, M. E., Senn, W., & Lüscher, H.-R. (2004). Top-down dendritic input increases the gain of layer 5 pyramidal neurons. *Cerebral cortex*, *14*(10), 1059-1070. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhh065>
- Lee, E., Taussig, R., & Gilman, A. G. (1992). The G226A mutant of Gs alpha highlights the requirement for dissociation of G protein subunits. *Journal of Biological Chemistry*, *267*(2), 1212-1218

- Lee, H.-K., Barbarosie, M., Kameyama, K., Bear, M. F., & Huganir, R. L. (2000). Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. *Nature*, *405*(6789), 955-959. <https://doi.org/10.1038/35016089>
- Lee, T.-S., Kaku, T., Takebayashi, S., Uchino, T., Miyamoto, S., Hadama, T., . . . Ono, K. (2006). Actions of mibefradil, efonidipine and nifedipine block of recombinant T-and L-type Ca²⁺ channels with distinct inhibitory mechanisms. *Pharmacology*, *78*(1), 11-20. <https://doi.org/10.1159/000094900>
- Li, M., Jia, M., Fields, R. D., & Nelson, P. G. (1996). Modulation of calcium currents by electrical activity. *Journal of neurophysiology*, *76*(4), 2595-2607. <https://doi.org/10.1152/jn.1996.76.4.2595>
- Liu, D.-D., Lu, J.-M., Zhao, Q.-R., Hu, C., & Mei, Y.-A. (2016a). Growth differentiation factor-15 promotes glutamate release in medial prefrontal cortex of mice through upregulation of T-type calcium channels. *Scientific Reports*, *6*, 28653. <https://doi.org/10.1038/srep28653>
- Liu, X., Grove, J. C., Hirano, A. A., Brecha, N. C., & Barnes, S. (2016b). Dopamine D1 receptor modulation of calcium channel currents in horizontal cells of mouse retina. *Journal of neurophysiology*, *116*(2), 686-697. <https://doi.org/10.1152/jn.00990.2015>
- Liu, X., Wang, W., Chen, W., Jiang, X., Zhang, Y., Wang, Z., . . . Yang, Z. (2015). Regulation of blood pressure, oxidative stress and AT1R by high salt diet in mutant human dopamine D5 receptor transgenic mice. *Hypertension Research*, *38*(6), 394-399. <https://doi.org/10.1038/hr.2015.17>
- López-Gil, X., Artigas, F., & Adell, A. (2010). Unraveling monoamine receptors involved in the action of typical and atypical antipsychotics on glutamatergic and serotonergic transmission in prefrontal cortex. *Current pharmaceutical design*, *16*(5), 502-515. <https://doi.org/10.2174/138161210790361416>
- López-Muñoz, F., & Alamo, C. (2009). The consolidation of neuroleptic therapy: Janssen, the discovery of haloperidol and its introduction into clinical practice. *Brain research bulletin*, *79*(2), 130-141. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2009.01.005>
- Lopez Soto, E. J., Agosti, F., Cabral, A., Mustafa, E. R., Damonte, V. M., Gandini, M. A., . . . Raingo, J. (2015). Constitutive and ghrelin-dependent GHSR1a activation impairs CaV2.1 and CaV2.2 currents in hypothalamic neurons. *J Gen Physiol*, *146*(3), 205-219. <https://doi.org/10.1085/jgp.201511383>
- Lu, J.-M., Liu, D.-D., Li, Z.-Y., Ling, C., & Mei, Y.-A. (2017). Neuritin enhances synaptic transmission in medial prefrontal cortex in mice by increasing CaV3.3 surface expression. *Cerebral cortex*, *27*(7), 3842-3855. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhx082>
- Lübbert, M., Goral, R. O., Keine, C., Thomas, C., Guerrero-Given, D., Putzke, T., . . . Young Jr, S. M. (2019). CaV2.1 α 1 subunit expression regulates presynaptic CaV2.1 abundance and synaptic strength at a central synapse. *Neuron*, *101*(2), 260-273. e266. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.11.028>
- Luo, F., Zheng, J., Sun, X., & Tang, H. (2017). Inward rectifier K⁺ channel and T-type Ca²⁺ channel contribute to enhancement of GABAergic transmission induced by β 1-adrenoceptor in the prefrontal cortex. *Experimental Neurology*, *288*, 51-61. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.11.007>
- Luttrell, L. M. (2016). GPCR signaling rides a wave of conformational changes. *Cell*, *167*(3), 602-603. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.006>

- Luvuno, M., Khathi, A., & Mabandla, M. V. (2020). The effects of exercise treatment on learning and memory ability, and cognitive performance in diet-induced prediabetes animals. *Scientific Reports*, 10(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72098-0>
- M'Kadmi, C. I., Cabral, A., Barrile, F., Giribaldi, J., Cantel, S., Damian, M., . . . Péraldi-Roux, S. (2018). N-terminal liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP2) region exhibits inverse agonist activity toward the ghrelin receptor. *Journal of medicinal chemistry*, 62(2), 965-973. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01644>
- Maddox, J. W., Randall, K. L., Yadav, R. P., Williams, B., Hagen, J., Derr, P. J., . . . Artemyev, N. (2020). A dual role for Cav1.4 Ca²⁺ channels in the molecular and structural organization of the rod photoreceptor synapse. *Elife*, 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.62184>
- Maingret, F., & Groc, L. (2021). Characterization of the functional cross-talk between surface GABAA and dopamine D5 receptors. *International journal of molecular sciences*, 22(9), 4867. <https://doi.org/10.3390/ijms22094867>
- Malinow, R., & Tsien, R. W. (1990). Presynaptic enhancement shown by whole-cell recordings of long-term potentiation in hippocampal slices. *Nature*, 346(6280), 177-180. <https://doi.org/10.1038/346177a0>
- Mallmann, R., Ondacova, K., Moravcikova, L., Jurkovicova-Tarabova, B., Pavlovicova, M., Moravcik, R., . . . Lacinova, L. (2019). Four novel interaction partners demonstrate diverse modulatory effects on voltage-gated CaV2.2 Ca²⁺ channels. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 471(6), 861-874. <https://doi.org/10.1007/s00424-018-02248-x>
- Mansour, A., Meador-Woodruff, J., Bunzow, J., Civelli, O., Akil, H., & Watson, S. (1990). Localization of dopamine D2 receptor mRNA and D1 and D2 receptor binding in the rat brain and pituitary: an in situ hybridization-receptor autoradiographic analysis. *Journal of Neuroscience*, 10(8), 2587-2600. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.10-08-02587.1990>
- Martin, M. W., Scott, A. W., Johnston Jr, D. E., Griffin, S., & Luedtke, R. R. (2001). Typical antipsychotics exhibit inverse agonist activity at rat dopamine D1-like receptors expressed in Sf9 cells. *European journal of pharmacology*, 420(2-3), 73-82. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(01\)00982-7](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(01)00982-7)
- Martinez Damonte, V., Rodríguez, S. S., & Raingo, J. (2018). Growth hormone secretagogue receptor constitutive activity impairs voltage-gated calcium channel-dependent inhibitory neurotransmission in hippocampal neurons. *The Journal of Physiology*, 596(22), 5415-5428. <https://doi.org/10.1113/JP276256>
- McCarthy, C. I., Chou-Freed, C., Rodríguez, S. S., Yaneff, A., Davio, C., & Raingo, J. (2020). Constitutive activity of dopamine receptor type 1 (D1R) increases CaV2.2 currents in PFC neurons. *Journal of General Physiology*, 152(5). <https://doi.org/10.1085/jgp.201912492>
- McNab, F., Varrone, A., Farde, L., Jucaite, A., Bystritsky, P., Forssberg, H., & Klingberg, T. (2009). Changes in cortical dopamine D1 receptor binding associated with cognitive training. *Science*, 323(5915), 800-802. <https://doi.org/10.1126/science.1166102>
- McNaughton, N., & Randall, A. (1997). Electrophysiological properties of the human N-type Ca²⁺ channel: I. Channel gating in Ca²⁺, Ba²⁺ and Sr²⁺ containing solutions. *Neuropharmacology*, 36(7), 895-915. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(97\)00085-3](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(97)00085-3)

- Meador-Woodruff, J., Mansour, A., Healy, D., Kuehn, R., Zhou, Q., Bunzow, J., . . . Watson Jr, S. (1991). Comparison of the distributions of D1 and D2 dopamine receptor mRNAs in rat brain. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 5(4), 231-242
- Meador-Woodruff, J. H., Mansour, A., Grandy, D. K., Damask, S. P., Civelli, O., & Watson Jr, S. J. (1992). Distribution of D5 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Neuroscience letters*, 145(2), 209-212. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(92\)90024-2](https://doi.org/10.1016/0304-3940(92)90024-2)
- Medvedev, I. O., Ramsey, A. J., Masoud, S. T., Bermejo, M. K., Urs, N., Sotnikova, T. D., . . . Salahpour, A. (2013). D1 dopamine receptor coupling to PLC β regulates forward locomotion in mice. *Journal of Neuroscience*, 33(46), 18125-18133. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2382-13.2013>
- Mende, F., Hundahl, C., Plouffe, B., Skov, L. J., Sivertsen, B., Madsen, A. N., . . . Frimurer, T. M. (2018). Translating biased signaling in the ghrelin receptor system into differential in vivo functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(43), E10255-E10264. <https://doi.org/10.1073/pnas.1804003115>
- Meye, F., Ramakers, G., & Adan, R. (2014). The vital role of constitutive GPCR activity in the mesolimbic dopamine system. *Translational psychiatry*, 4(2), e361. <https://doi.org/10.1038/tp.2013.130>
- Millán, C., & Sánchez-Prieto, J. (2002). Differential coupling of N-and P/Q-type calcium channels to glutamate exocytosis in the rat cerebral cortex. *Neuroscience letters*, 330(1), 29-32. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(02\)00719-x](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(02)00719-x)
- Milligan, G. (2003). Constitutive activity and inverse agonists of G protein-coupled receptors: a current perspective. *Molecular pharmacology*, 64(6), 1271-1276. <https://doi.org/10.1124/mol.64.6.1271>
- Mills, L. R., Niesen, C. E., So, A. P., Carlen, P. L., Spigelman, I., & Jones, O. T. (1994). N-type Ca²⁺ channels are located on somata, dendrites, and a subpopulation of dendritic spines on live hippocampal pyramidal neurons. *Journal of Neuroscience*, 14(11), 6815-6824. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-11-06815.1994>
- Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M., & Caron, M. G. (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiological reviews*, 78(1), 189-225. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.1.189>
- Miyamoto, S., Duncan, G., Marx, C., & Lieberman, J. (2005). Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs. *Molecular psychiatry*, 10(1), 79. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001556>
- Mlinar, B., & Enyeart, J. (1993). Block of current through T-type calcium channels by trivalent metal cations and nickel in neural rat and human cells. *The Journal of Physiology*, 469(1), 639-652. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1993.sp019835>
- Mochida, S. (2018). Presynaptic calcium channels. *Neuroscience research*, 127, 33-44. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2017.09.012>
- Momiyama, T., & Fukazawa, Y. (2007). D1-like dopamine receptors selectively block P/Q-type calcium channels to reduce glutamate release onto cholinergic basal forebrain neurones of immature rats. *The Journal of Physiology*, 580(1), 103-117. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.125724>
- Montague, D. M., Striplin, C. D., Overcash, J. S., Drago, J., Lawler, C. P., & Mailman, R. B. (2001). Quantification of D1B (D5) receptors in dopamine D1A receptor-

- deficient mice. *Synapse*, 39(4), 319-322. [https://doi.org/10.1002/1098-2396\(20010315\)39:4<319::AID-SYN1015>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/1098-2396(20010315)39:4<319::AID-SYN1015>3.0.CO;2-1)
- Moore, S. J., & Murphy, G. G. (2020). The role of L-type calcium channels in neuronal excitability and aging. *Neurobiology of learning and memory*, 173, 107230. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2020.107230>
- Moss, S. J., & Smart, T. G. (2001). Constructing inhibitory synapses. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(4), 240-250. <https://doi.org/10.1038/35067500>
- Mozrzymas, J. W., Barberis, A., & Cherubini, E. (1999a). Facilitation of miniature GABAergic currents by chlorpromazine in cultured rat hippocampal cells. *Neuroreport*, 10(11), 2251-2254. <https://doi.org/10.1097/00001756-199908020-00005>
- Mozrzymas, J. W., Barberis, A., Michalak, K., & Cherubini, E. (1999b). Chlorpromazine inhibits miniature GABAergic currents by reducing the binding and by increasing the unbinding rate of GABA_A receptors. *Journal of Neuroscience*, 19(7), 2474-2488. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-07-02474.1999>
- Mu, Q., Johnson, K., Morgan, P. S., Grenesko, E. L., Molnar, C. E., Anderson, B., . . . Knable, M. (2007). A single 20 mg dose of the full D1 dopamine agonist dihydroxidine (DAR-0100) increases prefrontal perfusion in schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 94(1-3), 332-341. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2007.03.033>
- Mustafa, E. R., Lopez Soto, E. J., Martinez Damonte, V., Rodriguez, S. S., Lipscombe, D., & Raingo, J. (2017). Constitutive activity of the Ghrelin receptor reduces surface expression of voltage-gated Ca(2+) channels in a CaVbeta-dependent manner. *J Cell Sci*, 130(22), 3907-3917. <https://doi.org/10.1242/jcs.207886>
- Navabpour, S., Kwapis, J. L., & Jarome, T. J. (2020). A neuroscientist's guide to transgenic mice and other genetic tools. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 108, 732-748. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.12.013>
- Neiens, P., Höfner, G., & Wanner, K. T. (2015). MS binding assays for D1 and D5 dopamine receptors. *ChemMedChem*, 10(11), 1924-1931. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201500355>
- Nichols, D. E. (2010). Dopamine receptor subtype-selective drugs: D1-like receptors *The dopamine receptors* (pp. 75-99): Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-333-6_4
- Nigam, A., Hargus, N. J., Barker, B. S., Ottolini, M., Hounshell, J. A., Bertram III, E. H., . . . Patel, M. K. (2019). Inhibition of T-Type calcium channels in mEC layer II stellate neurons reduces neuronal hyperexcitability associated with epilepsy. *Epilepsy research*, 154, 132-138. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2019.05.006>
- Nijenhuis, W. A., Oosterom, J., & Adan, R. A. (2001). AgRP (83–132) acts as an inverse agonist on the human-melanocortin-4 receptor. *Molecular Endocrinology*, 15(1), 164-171. <https://doi.org/10.1210/mend.15.1.0578>
- Nowycky, M. C., Fox, A. P., & Tsien, R. W. (1985). Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature*, 316(6027), 440-443. <https://doi.org/10.1038/316440a0>
- Numa, C., Nagai, H., Taniguchi, M., Nagai, M., Shinohara, R., & Furuyashiki, T. (2019). Social defeat stress-specific increase in c-Fos expression in the extended amygdala in mice: Involvement of dopamine D1 receptor in the medial prefrontal cortex. *Scientific Reports*, 9(1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52997-7>

- O'Dowd, B. F., Ji, X., Alijaniam, M., Nguyen, T., & George, S. R. (2011). Separation and reformation of cell surface dopamine receptor oligomers visualized in cells. *European journal of pharmacology*, 658(2-3), 74-83. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.02.030>
- Oerther, S., & Ahlenius, S. (2000). Atypical antipsychotics and dopamine D1 receptor agonism: an in vivo experimental study using core temperature measurements in the rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 292(2), 731-736
- Ogata, N., Yoshii, M., & Narahashi, T. (1990). Differential block of sodium and calcium channels by chlorpromazine in mouse neuroblastoma cells. *The Journal of Physiology*, 420(1), 165-183. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1990.sp017906>
- Oh, S. W., Harris, J. A., Ng, L., Winslow, B., Cain, N., Mihalas, S., . . . Henry, A. M. (2014). A mesoscale connectome of the mouse brain. *Nature*, 508(7495), 207-214. <https://doi.org/10.1038/nature13186>
- Okubo, T., Sato, A., Okamoto, H., Sato, T., & Sasaoka, T. (2018). Differential behavioral phenotypes of dopamine D1 receptor knockdown mice at the embryonic, postnatal, and adult stages. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 66, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2017.11.004>
- Okubo, Y., Sahara, T., Suzuki, K., Kobayashi, K., Inoue, O., Terasaki, O., . . . Matsushima, E. (1997). Decreased prefrontal dopamine D1 receptors in schizophrenia revealed by PET. *Nature*, 385(6617), 634. <https://doi.org/10.1038/385634a0>
- Otani, S., Bai, J., & Blot, K. (2015). Dopaminergic modulation of synaptic plasticity in rat prefrontal neurons. *Neuroscience bulletin*, 31(2), 183-190. <https://doi.org/10.1007/s12264-014-1507-3>
- Pafundo, D. E., Pretell Annan, C. A., Fulginiti, N. M., & Belforte, J. E. (2021). Early NMDA receptor ablation in interneurons causes an activity-dependent E/I imbalance in vivo in prefrontal cortex pyramidal neurons of a mouse model useful for the study of schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 47(5), 1300-1309. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbab030>
- Pandey, P., Mersha, M. D., & Dhillon, H. S. (2013). A synergistic approach towards understanding the functional significance of dopamine receptor interactions. *Journal of Molecular Signaling*, 8(1), 1-8. <https://doi.org/10.1186/1750-2187-8-13>
- Paxinos, G., & Franklin, K. B. (2019). *Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates*: Academic press
- Paz, R. M. S., Agostina M; Rela, Lorena; Murer, M Gustavo; Tubert, Cecilia (2022). D1/D5 inverse agonists restore striatal cholinergic interneuron physiology in dyskinetic mice. *Movement Disorders*. <https://doi.org/10.1002/mds.29055>
- Perreault, M. L., Hasbi, A., O'dowd, B. F., & George, S. R. (2014). Heteromeric dopamine receptor signaling complexes: emerging neurobiology and disease relevance. *Neuropsychopharmacology*, 39(1), 156-168. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.148>
- Perrier, J.-F., Alaburda, A., & Hounsgaard, J. (2002). Spinal plasticity mediated by postsynaptic L-type Ca²⁺ channels. *Brain research reviews*, 40(1-3), 223-229. [https://doi.org/10.1016/s0165-0173\(02\)00204-7](https://doi.org/10.1016/s0165-0173(02)00204-7)
- Pfeiffer-Linn, C., & Lasater, E. M. (1993). Dopamine modulates in a differential fashion T-and L-type calcium currents in bass retinal horizontal cells. *The Journal of general physiology*, 102(2), 277-294. <https://doi.org/10.1085/jgp.102.2.277>

- Pietrobon, D. (2002). Calcium channels and channelopathies of the central nervous system. *Molecular neurobiology*, 25(1), 31-50. <https://doi.org/10.1385/MN:25:1:031>
- Pinggera, A., Lieb, A., Benedetti, B., Lampert, M., Monteleone, S., Liedl, K. R., . . . Striessnig, J. (2015). CACNA1D de novo mutations in autism spectrum disorders activate Cav1.3 L-type calcium channels. *Biological psychiatry*, 77(9), 816-822. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.11.020>
- Plouffe, B., D'Aoust, J.-P., Laquerre, V., Liang, B., & Tiberi, M. (2010). Probing the constitutive activity among dopamine D1 and D5 receptors and their mutants *Methods in enzymology* (Vol. 484, pp. 295-328): Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381298-8.00016-2>
- Price, C. J., Kim, P., & Raymond, L. A. (1999). D1 dopamine receptor-induced cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation and potentiation of striatal glutamate receptors. *Journal of neurochemistry*, 73(6), 2441-2446. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0732441.x>
- Qian, J., & Noebels, J. L. (2001). Presynaptic Ca²⁺ channels and neurotransmitter release at the terminal of a mouse cortical neuron. *Journal of Neuroscience*, 21(11), 3721-3728. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-11-03721.2001>
- Rai, S., Tanaka, H., Suzuki, M., Espinoza, J. L., Kumode, T., Tanimura, A., . . . Kanakura, Y. (2020). Chlorpromazine eliminates acute myeloid leukemia cells by perturbing subcellular localization of FLT3-ITD and KIT-D816V. *Nature communications*, 11(1), 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17666-8>
- Raingo, J., Castiglioni, A. J., & Lipscombe, D. (2007). Alternative splicing controls G protein-dependent inhibition of N-type calcium channels in nociceptors. *Nature neuroscience*, 10(3), 285. <https://doi.org/10.1038/nn1848>
- Rajagopal, S., & Shenoy, S. K. (2018). GPCR desensitization: Acute and prolonged phases. *Cellular signalling*, 41, 9-16. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.01.024>
- Rame, M., Caudal, D., Schenker, E., Svenningsson, P., Spedding, M., Jay, T. M., & Godsil, B. P. (2017). Clozapine counteracts a ketamine-induced depression of hippocampal-prefrontal neuroplasticity and alters signaling pathway phosphorylation. *PloS one*, 12(5), e0177036. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177036>
- Ranganath, A., & Jacob, S. N. (2016). Doping the mind: dopaminergic modulation of prefrontal cortical cognition. *The Neuroscientist*, 22(6), 593-603. <https://doi.org/10.1177/1073858415602850>
- Remy, S., & Spruston, N. (2007). Dendritic spikes induce single-burst long-term potentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(43), 17192-17197. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707919104>
- Robison, L. S., Swenson, S., Hamilton, J., & Thanos, P. K. (2018). Exercise reduces dopamine D1R and increases D2R in rats: implications for addiction. *Med Sci Sports Exerc*, 50(8), 1596-1602. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000001627>
- Rajo, D., McCarthy, C., Raingo, J., & Rubinstein, M. (2020). Mouse models for V103I and I251L gain of function variants of the human MC4R display decreased adiposity but are not protected against a hypercaloric diet. *Molecular metabolism*, 42, 101077. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101077>

- Rose, J. E., & Woolsey, C. N. (1949). Organization of the mammalian thalamus and its relationships to the cerebral cortex. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*, 1(1-4), 391-404
- Saegusa, H., Li, X., Wang, X., Kayakiri, M., & Tanabe, T. (2020). Knockdown of microglial Cav2. 2 N-type voltage-dependent Ca²⁺ channel ameliorates behavioral deficits in a mouse model of Parkinson's disease. *FEBS letters*, 594(17), 2914-2922. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13853>
- Saegusa, H., Matsuda, Y., & Tanabe, T. (2002). Effects of ablation of N-and R-type Ca²⁺ channels on pain transmission. *Neuroscience research*, 43(1), 1-7. [https://doi.org/10.1016/s0168-0102\(02\)00017-2](https://doi.org/10.1016/s0168-0102(02)00017-2)
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006). The inoue method for preparation and transformation of competent E. coli: "ultra-competent" cells. *Csh Protoc*, 2006(1), 10.1101. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot3944>
- Santi, C. M., Cayabyab, F. S., Sutton, K. G., McRory, J. E., Mezeyova, J., Hamming, K. S., . . . Snutch, T. P. (2002). Differential inhibition of T-type calcium channels by neuroleptics. *Journal of Neuroscience*, 22(2), 396-403. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-02-00396.2002>
- Schneider, E. H., & Seifert, R. (2010). Coexpression systems as models for the analysis of constitutive GPCR activity *Methods in enzymology* (Vol. 485, pp. 527-557): Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381296-4.00028-2>
- Schroeder, C., Doering, C., Zamponi, G., & Lewis, R. (2006). N-type calcium channel blockers: novel therapeutics for the treatment of pain. *Medicinal Chemistry*, 2(5), 535-543. <https://doi.org/10.2174/157340606778250216>
- Seamans, J. K., Gorelova, N. A., & Yang, C. R. (1997). Contributions of voltage-gated Ca²⁺ channels in the proximal versus distal dendrites to synaptic integration in prefrontal cortical neurons. *Journal of Neuroscience*, 17(15), 5936-5948. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-15-05936.1997>
- Seifert, R., & Wenzel-Seifert, K. (2002). Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 366(5), 381-416. <https://doi.org/10.1007/s00210-002-0588-0>
- Serretti, A., Ronchi, D. D., Lorenzi, C., & Berardi, D. (2004). New antipsychotics and schizophrenia: a review on efficacy and side effects. *Current medicinal chemistry*, 11(3), 343-358. <https://doi.org/10.2174/0929867043456043>
- Shibanoki, S., Gotoh, Y., & Ishikawa, K. (1984). Determination, of chlorpromazine in the blood and brain of mice by high performance liquid chromatography combined with electrochemical detection. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 35(2), 169-174. <https://doi.org/10.1254/jjp.35.169>
- Shukla, A. K. (2014). Biasing GPCR signaling from inside. *Science signaling*, 7(310). <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005021>
- Siafis, S., Tzachanis, D., Samara, M., & Papazisis, G. (2018). Antipsychotic Drugs: From Receptor-binding Profiles to Metabolic Side Effects. *Current neuropharmacology*, 16(8), 1210-1223. <https://doi.org/10.2174/1570159X15666170630163616>
- Silva, F. R., Miranda, A. S., Santos, R. P., Olmo, I. G., Zamponi, G. W., Dobransky, T., . . . Ribeiro, F. M. (2017). N-type Ca²⁺ channels are affected by full-length mutant huntingtin expression in a mouse model of Huntington's disease. *Neurobiology of aging*, 55, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2017.03.015>

- Simms, B. A., & Zamponi, G. W. (2012). Trafficking and stability of voltage-gated calcium channels. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(6), 843-856
- Simms, B. A., & Zamponi, G. W. (2014). Neuronal voltage-gated calcium channels: structure, function, and dysfunction. *Neuron*, 82(1), 24-45. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.03.016>
- Sinnesger-Brauns, M. J., Huber, I. G., Koschak, A., Wild, C., Obermair, G. J., Einzinger, U., . . . Striessnig, J. (2009). Expression and 1, 4-dihydropyridine-binding properties of brain L-type calcium channel isoforms. *Molecular pharmacology*, 75(2), 407-414. <https://doi.org/10.1124/mol.108.049981>
- Skieterska, K., Duchou, J., Lintermans, B., & Van Craenenbroeck, K. (2013). Detection of G protein-coupled receptor (GPCR) dimerization by coimmunoprecipitation *Methods in cell biology* (Vol. 117, pp. 323-340): Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408143-7.00017-7>
- Smit, M. J., Vischer, H. F., Bakker, R. A., Jongejan, A., Timmerman, H., Pardo, L., & Leurs, R. (2007). Pharmacogenomic and structural analysis of constitutive G protein-coupled receptor activity. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 47(1), 53-87. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105126>
- Spruston, N. (2008). Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(3), 206-221. <https://doi.org/10.1038/nrn2286>
- Stanley, E. F. (2016). The nanophysiology of fast transmitter release. *Trends in Neurosciences*, 39(3), 183-197. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.01.005>
- Stephens, G. J., Morris, N. P., Fyffe, R. E., & Robertson, B. (2001). The Cav2. 1/ α 1A (P/Q-type) voltage-dependent calcium channel mediates inhibitory neurotransmission onto mouse cerebellar Purkinje cells. *European Journal of Neuroscience*, 13(10), 1902-1912. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01566.x>
- Striessnig, J., Pinggera, A., Kaur, G., Bock, G., & Tuluc, P. (2014). L-type Ca²⁺ channels in heart and brain. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling*, 3(2), 15-38. <https://doi.org/10.1002/wmts.102>
- Südhof, T. C. (2014). The molecular machinery of neurotransmitter release (Nobel lecture). *Angewandte Chemie International Edition*, 53(47), 12696-12717. <https://doi.org/10.1002/anie.201406359>
- Südhof, T. C., & Malenka, R. C. (2008). Understanding synapses: past, present, and future. *Neuron*, 60(3), 469-476. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.011>
- Surmeier, D. J., Bargas, J., Hemmings, H. C., Nairn, A. C., & Greengard, P. (1995). Modulation of calcium currents by a D1 dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons. *Neuron*, 14(2), 385-397. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90294-5](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90294-5)
- Takahashi, E., Ino, M., & Nagasu, T. (2004). Effect of genetic background on Cav2 channel α 1 and β subunit messenger RNA expression in cerebellum of N-type Ca²⁺ channel α 1B subunit-deficient mice. *Comp Med*, 54(6), 690-694
- Takemura, M., Kiyama, H., Fukui, H., Tohyama, M., & Wada, H. (1989). Distribution of the ω -conotoxin receptor in rat brain. An autoradiographic mapping. *Neuroscience*, 32(2), 405-416. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(89\)90089-4](https://doi.org/10.1016/0306-4522(89)90089-4)
- Tanaka, O., Sakagami, H., & Kondo, H. (1995). Localization of mRNAs of voltage-dependent Ca²⁺-channels: four subtypes of α 1- and β -subunits in developing and mature rat brain. *Molecular brain research*, 30(1), 1-16. [https://doi.org/10.1016/0169-328x\(94\)00265-g](https://doi.org/10.1016/0169-328x(94)00265-g)

- Tang, A.-H., Karson, M. A., Nagode, D. A., McIntosh, J. M., Uebele, V. N., Renger, J. J., . . . Alger, B. E. (2011). Nerve terminal nicotinic acetylcholine receptors initiate quantal GABA release from perisomatic interneurons by activating axonal T-type (Cav3) Ca²⁺ channels and Ca²⁺ release from stores. *Journal of Neuroscience*, *31*(38), 13546-13561. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2781-11.2011>
- Tao, Y.-X. (2014). Constitutive activity in melanocortin-4 receptor: biased signaling of inverse agonists. *Advances in pharmacology*, *70*, 135-154. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417197-8.00005-5>
- Tarabová, B., Nováková, M., & Lacinová, L. (2009). Haloperidol moderately inhibits cardiovascular L-type calcium current. *General physiology and biophysics*, *28*(3), 249. https://doi.org/10.4149/gpb_2009_03_249
- Teng, X., Chen, S., Nie, Y., Xiao, P., Yu, X., Shao, Z., & Zheng, S. (2022). Ligand recognition and biased agonism of the D1 dopamine receptor. *Nature communications*, *13*(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30929-w>
- Terragni, B., Scalmani, P., Franceschetti, S., Cestele, S., & Mantegazza, M. (2018). Post-translational dysfunctions in channelopathies of the nervous system. *Neuropharmacology*, *132*, 31-42. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.05.028>
- Thomas, P., & Smart, T. G. (2005). HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, *51*(3), 187-200. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2004.08.014>
- Thompson, J. L., Rosell, D. R., Slifstein, M., Girgis, R. R., Xu, X., Ehrlich, Y., . . . Siever, L. J. (2014). Prefrontal dopamine D1 receptors and working memory in schizotypal personality disorder: a PET study with [(1)(1)C]NNC112. *Psychopharmacology (Berl)*, *231*(21), 4231-4240. <https://doi.org/10.1007/s00213-014-3566-6>
- Tiberi, M., & Caron, M. G. (1994). High agonist-independent activity is a distinguishing feature of the dopamine D1B receptor subtype. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(45), 27925-27931
- Torz, L. J., Osborne-Lawrence, S., Rodriguez, J., He, Z., Cornejo, M. P., Mustafá, E. R., . . . Nybo, M. (2020). Metabolic insights from a GHSR-A203E mutant mouse model. *Molecular metabolism*, *39*, 101004. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101004>
- Truong, K., & Ikura, M. (2001). The use of FRET imaging microscopy to detect protein–protein interactions and protein conformational changes in vivo. *Current opinion in structural biology*, *11*(5), 573-578. [https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(00\)00249-9](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(00)00249-9)
- Umemiya, M., & Raymond, L. A. (1997). Dopaminergic modulation of excitatory postsynaptic currents in rat neostriatal neurons. *Journal of neurophysiology*, *78*(3), 1248-1255. <https://doi.org/10.1152/jn.1997.78.3.1248>
- Uylings, H. B., Groenewegen, H. J., & Kolb, B. (2003). Do rats have a prefrontal cortex? *Behavioural brain research*, *146*(1-2), 3-17. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2003.09.028>
- Vallone, D., Picetti, R., & Borrelli, E. (2000). Structure and function of dopamine receptors. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *24*(1), 125-132. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(99\)00063-9](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(99)00063-9)
- Van De Werd, H. J., & Uylings, H. B. (2014). Comparison of (stereotactic) parcellations in mouse prefrontal cortex. *Brain Structure and Function*, *219*(2), 433-459. <https://doi.org/10.1007/s00429-013-0630-7>

- van den Maagdenberg, A. M., Pietrobon, D., Pizzorusso, T., Kaja, S., Broos, L. A., Cesetti, T., . . . Plomp, J. J. (2004). A Cacna1a knockin migraine mouse model with increased susceptibility to cortical spreading depression. *Neuron*, *41*(5), 701-710. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(04\)00085-6](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(04)00085-6)
- Vekshina, N., Anokhin, P., Veretinskaya, A., & Shamakina, I. Y. (2017). Dopamine D1–D2 receptor heterodimers: A literature review. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, *11*(2), 111-119. <https://doi.org/10.1134/S199075081702010X>
- Wang, J. R., Sun, P. H., Ren, Z. X., Meltzer, H. Y., & Zhen, X. C. (2017a). GSK-3 β Interacts with dopamine D1 receptor to regulate receptor function: implication for prefrontal cortical D1 receptor dysfunction in schizophrenia. *CNS neuroscience & therapeutics*, *23*(2), 174-187. <https://doi.org/10.1111/cns.12664>
- Wang, S., Che, T., Levit, A., Shoichet, B. K., Wacker, D., & Roth, B. L. (2018). Structure of the D2 dopamine receptor bound to the atypical antipsychotic drug risperidone. *Nature*, *555*(7695), 269-273. <https://doi.org/10.1038/nature25758>
- Wang, S., Tan, X., Chen, P., Zheng, S., Ren, H., Cai, J., . . . Zeng, C. (2019). Role of thioredoxin 1 in impaired renal sodium excretion of hD 5 R F173L transgenic mice. *Journal of the American Heart Association*, *8*(8), e012192. <https://doi.org/10.1161/JAHA.119.012192>
- Wang, S., Wacker, D., Levit, A., Che, T., Betz, R. M., McCorvy, J. D., . . . Shoichet, B. K. (2017b). D4 dopamine receptor high-resolution structures enable the discovery of selective agonists. *Science*, *358*(6361), 381-386. <https://doi.org/10.1126/science.aan5468>
- Wang, Y., Chan, G. L., Holden, J. E., Dobko, T., Mak, E., Schulzer, M., . . . Stoessl, A. J. (1998). Age-dependent decline of dopamine D1 receptors in human brain: a PET study. *Synapse*, *30*(1), 56-61. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2396\(199809\)30:1<56::AID-SYN7>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2396(199809)30:1<56::AID-SYN7>3.0.CO;2-J)
- Wang, Y., Markram, H., Goodman, P. H., Berger, T. K., Ma, J., & Goldman-Rakic, P. S. (2006). Heterogeneity in the pyramidal network of the medial prefrontal cortex. *Nature neuroscience*, *9*(4), 534. <https://doi.org/10.1038/nn1670>
- Wass, C., Pizzo, A., Sauce, B., Kawasumi, Y., Sturzoiu, T., Ree, F., . . . Matzel, L. D. (2013). Dopamine D1 sensitivity in the prefrontal cortex predicts general cognitive abilities and is modulated by working memory training. *Learning & Memory*, *20*(11), 617-627. <https://doi.org/10.1101/lm.031971.113>
- Wass, C., Sauce, B., Pizzo, A., & Matzel, L. D. (2018). Dopamine D1 receptor density in the mPFC responds to cognitive demands and receptor turnover contributes to general cognitive ability in mice. *Scientific Reports*, *8*(1), 4533. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22668-0>
- Waters, J., Larkum, M., Sakmann, B., & Helmchen, F. (2003). Supralinear Ca²⁺ influx into dendritic tufts of layer 2/3 neocortical pyramidal neurons in vitro and in vivo. *Journal of Neuroscience*, *23*(24), 8558-8567. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-24-08558.2003>
- Weeks, J. C., Roberts, W. M., Leasure, C., Suzuki, B. M., Robinson, K. J., Currey, H., . . . Bird, T. D. (2018). Sertraline, paroxetine, and chlorpromazine are rapidly acting anthelmintic drugs capable of clinical repurposing. *Scientific Reports*, *8*(1), 1-17. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18457-w>
- Wehr, M., & Zador, A. M. (2003). Balanced inhibition underlies tuning and sharpens spike timing in auditory cortex. *Nature*, *426*(6965), 442-446. <https://doi.org/10.1038/nature02116>

- Wei, X., Neely, A., Lacerda, A. E., Olcese, R., Stefani, E., Perez-Reyes, E., & Birnbaumer, L. (1994). Modification of Ca²⁺ channel activity by deletions at the carboxyl terminus of the cardiac $\alpha 1$ subunit. *J Biol Chem*, *269*(3), 1635-1640
- Weiss, N., & Zamponi, G. W. (2017). Trafficking of neuronal calcium channels. *Neuronal Signaling*, *1*(1). <https://doi.org/10.1042/NS20160003>
- Weiss, N., & Zamponi, G. W. (2019). T-type calcium channels: from molecule to therapeutic opportunities. *The international journal of biochemistry & cell biology*, *108*, 34-39. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2019.01.008>
- Westenbroek, R. E., Hell, J. W., Warner, C., Dubel, S. J., Snutch, T. P., & Catterall, W. A. (1992). Biochemical properties and subcellular distribution of an N-type calcium channel $\alpha 1$ subunit. *Neuron*, *9*(6), 1099-1115. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90069-p](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90069-p)
- Westenbroek, R. E., Hoskins, L., & Catterall, W. A. (1998). Localization of Ca²⁺ channel subtypes on rat spinal motor neurons, interneurons, and nerve terminals. *Journal of Neuroscience*, *18*(16), 6319-6330. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-16-06319.1998>
- Williams, M. E., Brust, P. F., Feldman, D. H., Patthi, S., Simerson, S., Maroufi, A., . . . Harpold, M. M. (1992). Structure and functional expression of an ω -conotoxin-sensitive human N-type calcium channel. *Science*, *257*(5068), 389-395. <https://doi.org/10.1126/science.1321501>
- Wolfe, J. T., Wang, H., Howard, J., Garrison, J. C., & Barrett, P. Q. (2003). T-type calcium channel regulation by specific G-protein $\beta\gamma$ subunits. *Nature*, *424*(6945), 209-213. <https://doi.org/10.1038/nature01772>
- Xu, J., Long, L., Wang, J., Tang, Y., Hu, H., Soong, T., & Tang, F. (2010). Nuclear localization of Cav2. 2 and its distribution in the mouse central nervous system, and changes in the hippocampus during and after pilocarpine-induced status epilepticus. *Neuropathology and applied neurobiology*, *36*(1), 71-85. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2009.01044.x>
- Xu, P., Chen, A., Li, Y., Xing, X., & Lu, H. (2019). Medial prefrontal cortex in neurological diseases. *Physiological genomics*, *51*(9), 432-442. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00006.2019>
- Yamamoto, K., Fontaine, R., Pasqualini, C., & Vernier, P. (2015). Classification of dopamine receptor genes in vertebrates: nine subtypes in osteichthyes. *Brain, Behavior and Evolution*, *86*(3-4), 164-175. <https://doi.org/10.1159/000441550>
- Yang, C.-E., Lee, W.-Y., Cheng, H.-W., Chung, C.-H., Mi, F.-L., & Lin, C.-W. (2019). The antipsychotic chlorpromazine suppresses YAP signaling, stemness properties, and drug resistance in breast cancer cells. *Chemico-biological interactions*, *302*, 28-35. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.01.033>
- Yang, C. R., Seamans, J. K., & Gorelova, N. (1996). Electrophysiological and morphological properties of layers V-VI principal pyramidal cells in rat prefrontal cortex in vitro. *Journal of Neuroscience*, *16*(5), 1904-1921. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-05-01904.1996>
- Yi, G., Fan, Y., & Wang, J. (2019). Metabolic cost of dendritic Ca²⁺ action potentials in layer 5 pyramidal neurons. *Frontiers in neuroscience*, *13*, 1221. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01221>
- Yin, J., Chen, K.-Y. M., Clark, M. J., Hijazi, M., Kumari, P., Bai, X.-c., . . . Rosenbaum, D. M. (2020). Structure of a D2 dopamine receptor–G-protein complex in a lipid membrane. *Nature*, *584*(7819), 125-129. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2379-5>

- Zahrt, J., Taylor, J. R., Mathew, R. G., & Arnsten, A. F. (1997). Supranormal stimulation of D1 dopamine receptors in the rodent prefrontal cortex impairs spatial working memory performance. *Journal of Neuroscience*, *17*(21), 8528-8535. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-21-08528.1997>
- Zaitsev, A., Povysheva, N., Lewis, D., & Krimer, L. (2007). P/Q-type, but not N-type, calcium channels mediate GABA release from fast-spiking interneurons to pyramidal cells in rat prefrontal cortex. *Journal of neurophysiology*, *97*(5), 3567-3573. <https://doi.org/10.1152/jn.01293.2006>
- Zamponi, G. (1999). Cytoplasmic determinants of piperidine blocking affinity for N-type calcium channels. *The Journal of membrane biology*, *167*(2), 183-192. <https://doi.org/10.1007/s002329900482>
- Zamponi, G., Bourinet, E., & Snutch, T. (1996). Nickel block of a family of neuronal calcium channels: subtype-and subunit-dependent action at multiple sites. *The Journal of membrane biology*, *151*(1), 77-90. <https://doi.org/10.1007/s002329900059>
- Zamponi, G. W., & Currie, K. P. M. (2013). Regulation of CaV2 calcium channels by G protein coupled receptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1828*(7), 1629-1643. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.10.004>
- Zamponi, G. W., Striessnig, J., Koschak, A., & Dolphin, A. C. (2015). The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. *Pharmacological Reviews*, *67*(4), 821. <https://doi.org/10.1124/pr.114.009654>
- Zhang, B., Albaker, A., Plouffe, B., Lefebvre, C., & Tiberi, M. (2014). Constitutive activities and inverse agonism in dopamine receptors *Advances in pharmacology* (Vol. 70, pp. 175-214): Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417197-8.00007-9>
- Zhang, B., Guo, F., Ma, Y., Song, Y., Lin, R., Shen, F.-Y., . . . Liu, Z.-Q. (2017). Activation of D1R/PKA/mTOR signaling cascade in medial prefrontal cortex underlying the antidepressant effects of I-SPD. *Scientific Reports*, *7*(1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03680-2>
- Zhang, B., Yang, X., & Tiberi, M. (2015). Functional importance of two conserved residues in intracellular loop 1 and transmembrane region 2 of Family A GPCRs: Insights from ligand binding and signal transduction responses of D1 and D5 dopaminergic receptor mutants. *Cellular signalling*, *27*(10), 2014-2025. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.07.006>
- Zhao, T., Chen, Y., Sun, Z., Shi, Z., Qin, J., Lu, J., . . . Song, X. (2020). Prenatal sevoflurane exposure causes neuronal excitatory/inhibitory imbalance in the prefrontal cortex and neurofunctional abnormality in rats. *Neurobiology of Disease*, *146*, 105121. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105121>
- Zhuang, X., Belluscio, L., & Hen, R. (2000). G α mediates dopamine D1 receptor signaling. *Journal of Neuroscience*, *20*(16). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-16-j0001.2000>
- Zhuang, Y., Xu, P., Mao, C., Wang, L., Krumm, B., Zhou, X. E., . . . Huang, X.-P. (2021). Structural insights into the human D1 and D2 dopamine receptor signaling complexes. *Cell*, *184*(4), 931-942. e918. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.027>