

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ
FACULTAD DE MEDICINA
TRABAJO FIN DE MÁSTER EN TERAPIA OCUPACIONAL
EN NEUROLOGÍA



Título: Papel del transportador de dopamina en el sistema dopaminérgico.

Identificación de las poblaciones neuronales implicadas

Autor: Pozo Bermúdez, Beatriz

Nº expediente: 83

Tutor: De Puelles Martínez de la Torre, Eduardo

Cotutor: Company Devesa, Verónica

Departamento y Área: Histología y Anatomía, Área de Anatomía y Embriología Humana

Curso académico 2016 - 2017

Convocatoria de Junio

A D. Eduardo de Puellas y Dña. Verónica Company por su atención, enseñanza y ayudarme a descubrir el apasionante campo de la investigación del sistema dopaminérgico.



INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 El sistema dopaminérgico.....	3
1.2 Las catecolaminas	3
1.3 La dopamina	3
1.4 El transportador de dopamina	4
1.5 La importancia de DAT en el ámbito clínico	5
1.5.1 Trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH).....	5
1.5.2 Enfermedad mental	6
1.5.3 Acción de drogas.....	6
1.5.4 Desórdenes alimenticios	7
1.5.5 Enfermedad de Parkinson	7
2. HIPÓTESIS DE ESTUDIO.....	9
3. OBJETIVO DE ESTUDIO	9
4. MATERIAL Y MÉTODOS	10
2.1 Criterios de selección.....	10
2.2 Proceso de realización de las muestras	11
5. RESULTADOS.....	15
6. DISCUSIÓN	27
7. CONCLUSIÓN.....	28
ANEXOS.....	29
BIBLIOGRAFÍA.....	29

RESUMEN

Introducción: El transportador de dopamina (DAT) actúa a nivel presináptico transportando la dopamina desde el espacio sináptico hacia el interior de la neurona presináptica, en la cual puede ser almacenada en vesículas o recaptada. Diversos estupefacientes y fármacos actúan directamente en DAT y también es utilizado como marcador para la enfermedad de Parkinson.

Hipótesis de trabajo: DAT no es un elemento presináptico exclusivamente y está presente en neuronas no dopaminérgicas como un elemento postsináptico.

Objetivo: Comprobar la distribución de DAT durante el desarrollo pre y postnatal del cerebro de ratón comparando dicha distribución con el patrón de neuronas dopaminérgicas (TH positiva).

Material y métodos: Este estudio se ha llevado a cabo con material procedente de ratones de tipo Engrailed 1 Cre de diferentes estadios mediante técnicas histológicas e inmunohistoquímicas.

Resultados: El área tegmental ventral, sustancia negra así como sus proyecciones hacia el estriado, bulbo y tracto olfatorio presentan marcajes positivos para TH y para DAT. En determinadas zonas del tálamo y locus coeruleus aparece marcaje solo para TH. Sorprendentemente, en el área de la formación reticular del rombencéfalo y en zonas del bulbo olfatorio hay presencia de marcaje únicamente para DAT y por tanto, habiendo ausencia de neuronas dopaminérgicas.

Discusión: DAT actúa también como componente postsináptico en otras áreas en las que no hay neuronas dopaminérgicas. Hasta la fecha se desconocía este hecho y, por tanto, todas las características que se conocían de DAT así como las sustancias que actúan en él puede que actúen de forma diferente a la evidenciada afectando a más dominios de los estudiados.

Conclusión: DAT actúa tanto nivel presináptico como postsináptico y, por tanto se confirma la hipótesis establecida

Palabras clave: Transportador de dopamina, DAT, Neuronas dopaminérgicas, Presináptico, Postsináptico

ABSTRACT

Introduction: The Dopamine transporter (DAT) belongs to the family of monoamines. It's found in the cellular membrane of the dopaminergic cells. DAT acts in the presynaptic cells carrying dopamine inside the dopaminergic cell from the synaptic cleft. Finally, dopamine is stored in the vesicles or can be recaptured. Several drugs act in DAT. DAT is used for Parkinson diagnosis too.

Working Hypothesis: DAT is not a presynaptic element exclusively. It's in no dopaminergic cells like a postsynaptic element.

Objective: Verify DAT distribution during prenatal and postnatal development comparing to dopaminergic cells distribution in a mouse brain.

Materials and methods: This investigation has been done with prenatal and postnatal Engrailed 1 Cre mice by histology and immunohistochemistry methods.

Results: Ventral tegmental area, substantia nigra pars compacta and the striated projections are positive to both markers. In thalamic areas and Locus coeruleus there is only TH marker. Surprisingly, olfactory bulb and little areas of the olfactory bulb are positive only for DAT.

Discussion: DAT acts like a postsynaptic component in areas without dopaminergic cells. It was unknown and for that reason, all DAT characteristics and substances that act in it could act in another areas of the brain. This is important in clinical practice, because several pharmacological drugs act directly in DAT.

Conclusions: DAT acts in presynaptic and postsynaptic cells so, we can confirm the established hypothesis.

Keywords: Dopamine transporter, DAT, Dopaminergic cells, Presynaptic, Postsynaptic

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El sistema dopaminérgico

El sistema dopaminérgico es una estructura anatomofuncional que se extiende desde el área tegmental ventral, a nivel del tronco encefálico y llega con sus proyecciones de fibras al hipotálamo, y de allí a la corteza frontal. Su neurotransmisor es la dopamina, perteneciente al grupo de las catecolaminas¹.

1.2 Las catecolaminas

Las catecolaminas son un grupo de neurotransmisores que comparten la porción catecol, es decir, un anillo benceno hidroxilado. Forman un subgrupo distinto dentro de las aminas biógenas. Incluyen la dopamina, noradrenalina y adrenalina.²

El aminoácido tirosina es el precursor de las tres catecolaminas. La tirosina es captada por las células cromafines, transformándose en dihidroxifenilalanina por acción de una hidroxilasa y luego se transforma en dopamina por acción de una carboxilasa.²

Tras ello, se convierte en norepinefrina por otra hidroxilasa y finalmente a epinefrina por la acción de la feniletanolamina N-metil transferasa.

1.3 La dopamina

La dopamina es una catecolamina clasificada como neurotransmisor de molécula pequeña. Dentro de esa clasificación, se categoriza a su vez como una amina biógena. Se encuentra presente en todas las regiones encefálicas, aunque el área principal donde se encuentra es en el estriado, que recibe las principales aferencias desde la sustancia negra. La dopamina tiene cinco receptores celulares: D1, D2, D3, D4 y D5. Es producida en una amplia variedad de animales, vertebrados e invertebrados.²

Entre sus funciones más conocidas encontramos el aumento de la frecuencia y presión cardíaca, regulación del sueño, actividad motora, sistemas de recompensa, comportamiento, cognición, inhibición de la función de prolactina, humor y aprendizaje. En el lóbulo frontal regula funciones como la memoria, atención y solución de problemas. Tiene una función muy importante en los espacios sinápticos y también actúa como hormona dependiendo de donde se secrete, hacia donde se secrete y su función.²

La distribución de dopamina a través de las diferentes áreas cerebrales se realiza a través de las vías dopaminérgicas mesolímbica, nigroestriatal y mesocortical.

La vía mesolímbica se encarga de transmitir la dopamina desde el área tegmental ventral hasta el núcleo accumbens. Se encuentra ubicada en el mesencéfalo y se relaciona con el mecanismo de recompensa. Alteraciones en esta vía están estrechamente relacionadas con el trastorno de esquizofrenia.

La vía nigroestriatal transmite la dopamina desde la sustancia negra hasta el cuerpo estriado. Alteraciones en esta vía se encuentran asociadas a la enfermedad de Parkinson.

Por último, se encuentra la vía mesocortical, la cual transmite dopamina desde el mesencéfalo hasta la corteza y se encuentra relacionada con la hiperprolactemia.

La acción de la dopamina en la hendidura sináptica concluye con la recaptación de dopamina en las terminales nerviosas o células gliales circundantes a través de un transportador de dopamina dependiente de Na^+/Cl^- denominado DAT.³

1.4 El transportador de dopamina

El transportador de dopamina (DAT) es una proteína que pertenece a la familia de los transportadores de monoaminas. Se encuentra en la membrana celular de las neuronas dopaminérgicas y transporta la dopamina desde el espacio sináptico hacia el interior de la terminal presináptica en la cual puede ser almanecada en vesículas o degradada. La recaptación de dopamina por medio de DAT es el principal mecanismo por el cual la dopamina es eliminada de la sinapsis.

En 1991 se descubrió DAT y se logró la primera caracterización del transportador de dopamina en rata. En 1992 se logró clonar el gen de DAT humano que se encuentra en el brazo corto del cromosoma 5 y también caracterizar la proteína correspondiente, con la cual rDAT tenía un 92% de homogeneidad.⁴

La distribución de DAT tiene lugar en los circuitos de las neuronas dopaminérgicas. Su mayor concentración se encuentra en dendritas y cuerpos celulares de las neuronas de la parte compacta de la sustancia negra y el área tegmental ventral. También se encuentra en el cuerpo estriado y núcleo accumbens, área motora, premotora, cíngulo anterior y área prefrontal, entorrinal, perirrinal, insular y visual de la mesocorteza. En el estriado los DAT se encuentran localizados en la membrana plasmática de las terminales axónicas.⁵

La señalización y distribución de dopamina es regularizada por diversos factores, incluyendo DAT.

1.5 La importancia de DAT en el ámbito clínico

Una alteración de la función de DAT supone irregularidades en la cantidad de dopamina que se recapta hacia la terminal presináptica así como a la que queda en el espacio sináptico. Por consecuencia, esas alteraciones contribuyen a desórdenes en el sistema nervioso central.

1.5.1 Trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH)

Diversos medicamentos psicoestimulantes prescritos para pacientes con TDAH, los cuales contienen amfetamina en su composición interactúan mediante la inhibición de DAT.⁶

Diversas líneas de evidencia científica sugieren que una disfunción en DAT puede contribuir al trastorno por déficit de atención e hiperactividad. Múltiples estudios genéticos en pacientes han demostrado la asociación entre las variables genéticas de DAT con TDAH.⁷

1.5.2 Esquizofrenia

La hipótesis de la influencia de la dopamina en el desencadenamiento de la esquizofrenia es una de las teorías más establecidas hasta la fecha. La influencia de la dopamina es demostrada tras las observaciones clínicas de psicosis inducida por anfetaminas y su efectividad en el receptor D2 de dopamina.

Estudios realizados con un modelo de ratón con eliminación de DAT contrastan que éste muestra comportamientos similares a los síntomas de esquizofrenia.

Los pacientes con esquizofrenia en su primer episodio psicótico presentan una concentración del DAT estriatal menor que la de los sujetos sanos. Así mismo, la alteración anatómico-funcional más relevante de DAT en esquizofrenia es la disminución putaminal. No obstante, el caudado podría también estar afectado.⁸

1.5.3 Acción de drogas

El transportador de dopamina es actualmente uno de los referentes terapéuticos para el tratamiento de adicción a psicoestimulantes. Esto es debido a la alta evidencia de que la cocaína, anfetamina, metanfetamina ejercen una fuerte estimulación y efectos eufóricos debido a su interferencia con DAT. La cocaína bloquea el transportador, impide la recaptación de dopamina por las terminales nerviosas e incrementa el nivel de dopamina en la hendidura sináptica en cantidad y tiempo, y por ello, se justifica su efecto. Por otro lado la anfetamina y metanfetamina producen una gran elevación de dopamina en el espacio extracelular debido a su liberación desde las vesículas donde se almacena y a la reversión del transporte por medio de DAT. El objetivo de la búsqueda de tratamientos farmacológicos se centra en la identificación de sustancias que actúen con efectos similares y que impidan la unión a DAT.⁹

1.5.4 Relación con obesidad y conductas alimenticias.

Históricamente, los primeros tratamientos para controlar el sobrepeso eran a base de anfetaminas, las cuales tenían la función de suprimir el apetito. Posteriormente se comprobó que los efectos sobre la alimentación se encontraban ligados a la activación de receptores dopaminérgicos D2. De acuerdo con la evidencia existente, los efectos de la dopamina bajo la influencia de la anfetamina se asocian con una reducción del neuropéptido Y y su ARNm.

La anfetamina usada para el tratamiento de la obesidad lucha con la dopamina por la unión a DAT haciendo que éste funcione en sentido opuesto y suceda un incremento del nivel de dopamina extracelular, lo cual aumenta la probabilidad de que se activen los receptores dopaminérgicos. Esta activación no selectiva causa los efectos anorexigénicos de la anfetamina.

Por otro lado, se ha observado que la restricción crónica de alimento puede disminuir la expresión de DAT en la superficie de sinaptosomas del estriado, donde la dopamina muestra una afinidad normal hacia el DAT. Cabe decir que no se han realizado estudios sobre la sensibilidad de DAT en la privación de alimentos.¹⁰

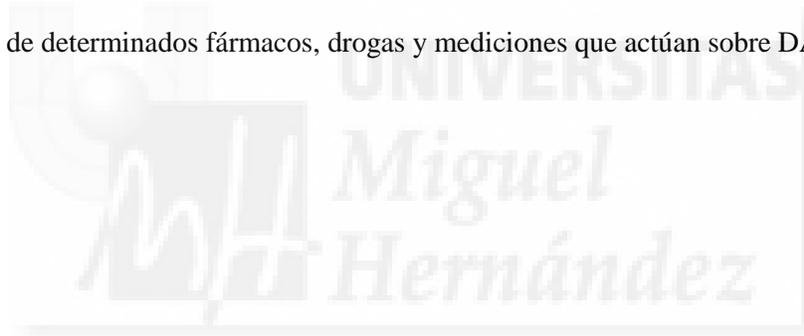
1.5.5 Enfermedad de Parkinson

Se ha observado que la concentración de DAT aparece disminuida cuando se produce una despoblación neuronal de aproximadamente 50% en la sustancia negra pars compacta, lo que va homologado a la aparición de sintomatología neurológica.⁸

Debido a que la distribución de DAT en el sistema nervioso central coincide con la inervación dopaminérgica, se han desarrollado diversos radioligandos derivados del tropano, análogos a la cocaína, para medir in vivo la densidad de DAT mediante PET y SPECT. Esto proporciona una medida indirecta de la integridad del sistema dopaminérgico presináptico y en los pacientes con enfermedad de parkinson constituyen un método adecuado para diferenciar pacientes

en etapas tempranas con déficit en el sistema dopaminérgico de aquellos sin afectación, con una sensibilidad cercana al 90% ¹¹

De acuerdo con la literatura estudiada hasta el momento, el transportador de dopamina (DAT) siempre ha sido considerado como un elemento que ejerce su función a nivel presináptico mediante la recaptación de dopamina pero es un elemento de relativamente reciente descubrimiento, y por tanto sería necesario verificar si su dominio se reduce a ser solo un elemento presináptico. Por ello se plantea comprobar si se encuentra en otras áreas diferentes en las que no hay neuronas dopaminérgicas y por consecuencia ejercería función a nivel postsináptico también. Este hecho es relevante ya que si estuviese presente también a nivel postsináptico, modificaría el conocimiento sobre el efecto de determinados fármacos, drogas y mediciones que actúan sobre DAT.



2. HIPÓTESIS DE ESTUDIO

DAT no es un elemento presináptico exclusivamente y está presente en neuronas no dopaminérgicas como un elemento postsináptico.

3. OBJETIVO DE ESTUDIO

Comprobar la distribución de DAT durante el desarrollo pre y postnatal del cerebro de ratón comparando dicha distribución con el patrón de neuronas dopaminérgicas (TH positiva).



4. MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha llevado a cabo un estudio observacional descriptivo en el laboratorio del Dr. de Puellas, situado en el instituto de Neurociencias de San Juan de Alicante durante el mes de marzo.

Para llevar a cabo el estudio, se ha utilizado el ratón como modelo animal. Los animales fueron obtenidos del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad Miguel Hernández. Los ratones fueron tratados de acuerdo a las regulaciones y leyes de la Unión Europea (Directiva 2003/65/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de Julio de 2003) y del Gobierno Español (Real decreto 53/2013, del 1 de febrero de 2013) sobre la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos. Los animales fueron tratados por personal acreditado.

Los ratones utilizados fueron dos líneas transgénicas adquiridas de la compañía Jackson Laboratories. Una de ellas fue Datcre (número de stock 020080), este ratón contiene la endonucleasa cre bajo el promotor del transportador de dopamina y la otra fue td Tomate (número de stock 007576), este ratón posee un a proteína roja fluorescente bloqueada por una secuencia stop que es escindida al encontrarse con la endonucleasa. Por lo tanto las células de los animales dobles heterocigotos que expresan el trasportador de dopamina se volverán rojo fluorescente.

2.1 Criterios de selección

El periodo gestacional del ratón dura alrededor de 18 días y las neuronas dopaminérgicas comienzan a observarse a partir del día 12, por tanto, se han escogido ratones de los siguientes estadíos teniendo en cuenta que el día en el que se detecta la cópula se toma como estado E0.5. Cabe resaltar que las muestras de los ratones de estadío P21 y P22 han sido recogidos de un estudio previo realizado en el laboratorio del Dr. De Puellas. De cada estadío se han escogido 2 ratones. Uno destinado para realizar cortes en plano coronal y otro destinado para realizar cortes en plano sagital.

- 2 embriones E15.5 : Embriones de 15 días y medio.
- 2 embriones E18.5: Embriones de 18 días y medio..

- 2 ratones P21: Ratones nacidos que se encuentran en el día 21..
- 2 ratones P22: Ratones nacidos que se encuentran en el día 22. 2.2 Proceso de realización de las muestras

El objetivo era someter los cortes a una tinción mediante inmunohistoquímica para poder observar mediante microscopia aquellas poblaciones sensibles a DAT y aquellas en las que se encuentran las neuronas dopaminérgicas.

1. Fijación de los embriones

El proceso de fijación se realizó por el motivo de impedir las modificaciones post mortem que pueda sufrir el tejido y así manteniendo su estructura morfológica sin que ocurran cambios notables en células y tejidos. Para ello, se incluyó a los embriones en una solución de paraformaldehído al 4% en PBS durante un tiempo estimado de 24 horas. Al día siguiente se realizaron dos lavados en PBS (Phosphate Buffered Saline) de 40 minutos.

A continuación, se les practicó una deshidratación en etanol de graduación creciente de 100, 75°, 50° y 25° de 30 minutos cada uno. Tras ello se les practicaron dos lavados de PBS de un tiempo de 30 minutos cada uno con la finalidad de eliminar el exceso de etanol de los embriones.

2. Inclusión y corte de los bloques.

Posteriormente se llevó a cabo la inclusión de los embriones en bloques de agarosa con la finalidad de conocer con profundidad la distribución de las poblaciones a observar. Tras la solidificación del bloque de agarosa, se llevó a cabo el corte del mismo mediante un microtomo de cuchilla vibratoria Leica VT1000 S. El microtomo realizó cortes de un grosor de 80 micras a los bloques en el plano coronal y sagital. Tras obtener cada corte, éstos se clasificaban en diferentes recipientes por el motivo de que a cada recipiente se le aplicaría un anticuerpo diferente. Cada recipiente contenía una solución de PBS para evitar que se secan los cortes.

3. Técnica de inmunohistoquímica

Tras el corte de los bloques, se realizó una técnica de inmunohistoquímica. Este proceso tiene la finalidad de demostrar la variedad de antígenos presentes en las células o tejidos utilizando anticuerpos marcados mediante técnicas de inmunotinción. Se utilizaron técnicas de inmunoperoxidasa aplicando un complejo de avidina-biotina ligada a peroxidasa (complejo AB) en oscuridad.

Protocolo:

- 3 lavados con PBS-T (100ml PBS 10x Inmuno + 900 ml H₂O + 1ml Tritón 0,1%) [3 lavados 7min]
- 1 lavado de 30 minutos con H₂O₂ en oscuridad (0,15 ml H₂O₂+ 10ml PBS-T)
- 3 lavados de 7 minutos con PBS-T
- 1 lavado de 1 hora con solución de bloqueo (BSA 1%+ Lisina 1M)
- Incubación de Ac Primario cx 36 1:100 (15 u L Ac + 10 ml Lisina-BSA-Azida) [Toda la noche]
- 3 lavados de 7 minutos con PBS-T
- Incubación de Ac Secundario Anti rabbit in Goat 1:200 (3 ml PBS + 60u GAR) [1 hora]
- 3 lavados de 7 minutos con PBS-T
- Adición de complejo AB en oscuridad preparado 30 minutos antes a 4° en oscuridad. 1:500 [1 hora] (6u A + 6u B+ 3ml PBS-T)
- 6 lavados con solución de PBS-T de 7 minutos cada uno
- 2 lavados con solución PBS en concentración 1x
- Revelado con DAB en oscuridad (1 ml DAB+100ml Tris 0,05 M+6 () L H₂O₂)

Explicación del protocolo:

Inicialmente se realizan 3 lavados con el complejo PBS-T. El tritón incluido en la disolución actúa como detergente creando poros para que el anticuerpo pueda introducirse en el tejido más eficientemente.

El siguiente paso es la adición de peróxido de hidrógeno, el cual bloquea la actividad de la peroxidasa endógena ya que es importante evitar su función. Tras ello se vuelven a realizar tres lavados con PBS-T.

Con la adición del bloqueo se evitan uniones inespecíficas del anticuerpo con el tejido, permitiendo solamente uniones específicas de Antígeno.

En la incubación del Anticuerpo primario se añade azida para la conservación del anticuerpo y su tejido. También para su reutilización. Se debe de añadir el complejo AB para que el anticuerpo 2º pueda estar biotinilado y reaccionen entre ellos.

Se reveló la muestra con DAB (diaminobenzidina tetrahidroclorhídrica) junto con agua oxigenada en oscuridad. Se le añade Tris ya que en su presencia ambos compuestos actúan mejor. El compuesto DAB al ser modificado por la peroxidasa se vuelve insoluble y produce un precipitado de color marrón, creando una tinción en los tejidos. El tiempo que deben estar las muestras en tal complejo se estima mediante la comprobación progresiva en microscopio de las muestras y la tinción que están obteniendo mientras se encuentran inmersas en el mismo.

4. Cubrir el portaobjetos

Cuando se obtuvo el marcaje de los tejidos, se llevaron a cabo 6 lavados en PBS y se sacaron las muestras de los recipientes en los que se habían colocado tras el corte con el micrótomo para montarlas en portaobjetos. Posteriormente se comenzó a poner los cubres en el portaobjetos, adheridos con un pegamento llamado *Eukit* para sellar la muestra y que no resultase alterada con un agente externo. Cuando se colocaron los cubres adecuadamente se dejaron los portas a temperatura ambiente.

5. Foto a la muestra

Por último, se procedió a fotografiar cada una de las muestras obtenidas y montadas en el portaobjetos mediante una cámara de 26x para así observar adecuadamente las poblaciones que habían sido positivas para TH y RFP.



5. RESULTADOS

Procedimos a analizar los distintos estadios prenatales y postnatales en secciones sagitales y coronales.

Figura 1

El estadio más temprano fue E15.5, en cortes sagitales (Fig.1A-D) con marcaje para TH (Fig.1A y C) y RFP (Fig.1B y D) pudimos observar que la Sustancia negra y el Área tegmental ventral aparecen positivas para los dos marcadores. Sorprendentemente aparecen tanto en el mesencéfalo, cerca del ventrículo, en el diencéfalo y en el rombencéfalo neuronas positivas para TH que no presentan DAT (comparar Fig.1A y B). En secciones sagitales más laterales (comparar Fig.1C y D) podemos ver de una forma muy clara las fibras que salen de la Sustancia Negra para proyectar al estriado conformando el tracto nigroestriatal. Dichas fibras son positivas para los dos marcadores. Destacar que con el marcaje TH podemos identificar el Locus coeruleus en el rombencéfalo. Esta población es negativa a DAT, esto se debe a que estas neuronas no usan dopamina como neurotransmisor, sino que utilizan noradrenalina.

Observando cortes en el plano coronal del mismo estadio (Fig.1 E-H) con marcaje para TH (Fig.1E y G) y RFP (Fig.1F y H) podemos destacar de nuevo el tracto nigroestriatal positivo para ambos marcadores que esta ocasión lo vemos llegando a su destino en el estriado (comparar Fig.1E y F). En niveles más caudales, realizando un corte puro transversal al mesencéfalo (comparar Fig.1G y H) podemos identificar con claridad la Sustancia negra y el Área tegmental ventral positivos para ambos marcadores. Sin embargo, hay que destacar que el marcaje de DAT en el área tegmental ventral es menos denso que en la Sustancia negra y volvemos a confirmar, como observamos en el plano sagital, que cercano al ventrículo hay neuronas positivas para Th que no lo son para DAT.

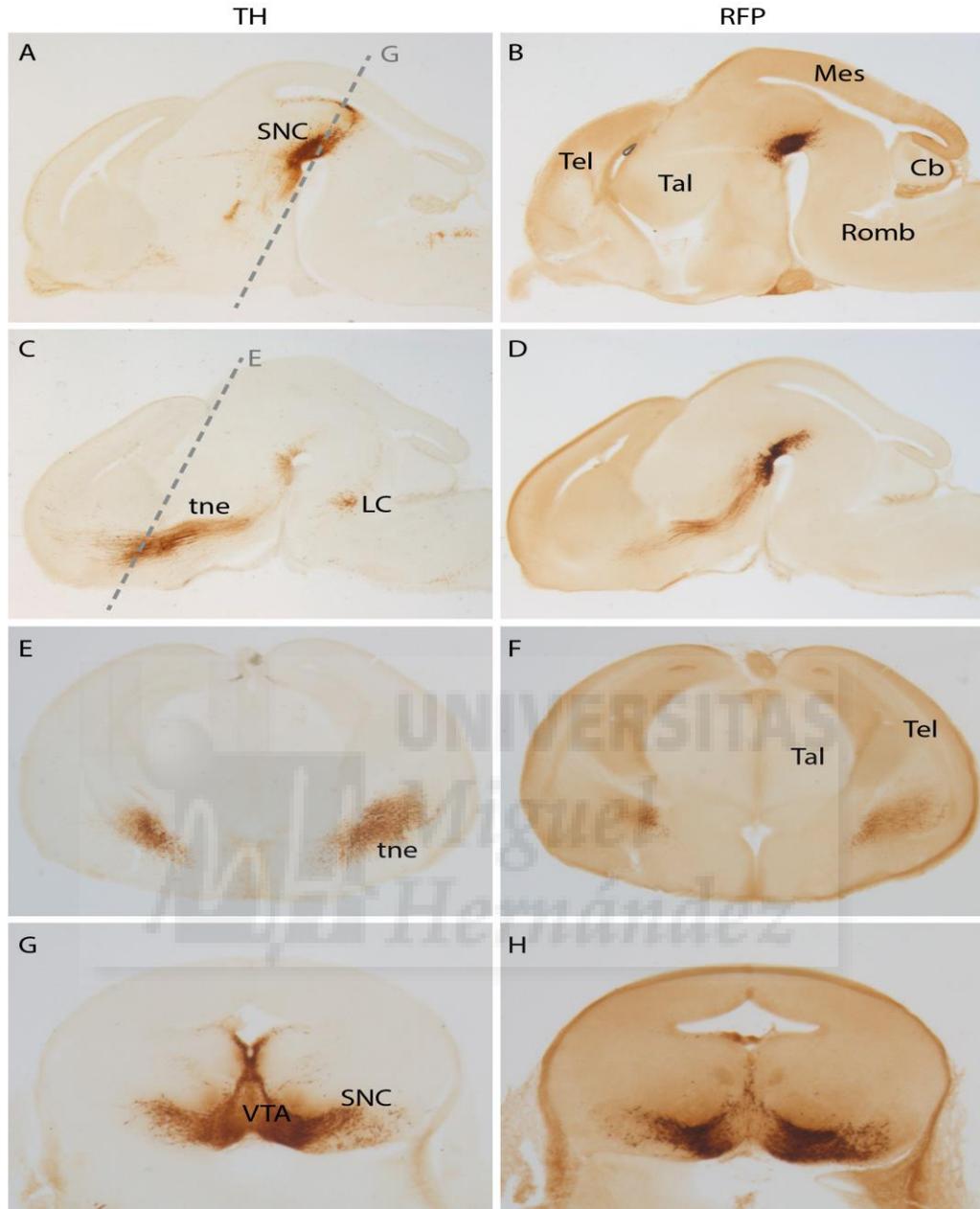


Figura 1: Cortes sagitales (Fig 1. A-D) y coronales (Fig 1. E-H) de dos embriones en el estadio E15.5 procesados con diferentes técnicas de inmunohistoquímica: TH para los cortes A, C, E y G, RFP para los cortes B, D, F, H. **Fig 1A y 1C:** Representación mediante línea discontinua gris, en plano sagital, de la localización del corte correspondiente a la imagen 1G y 1E respectivamente **Abreviaturas:** SNC, Sustancia negra pars compacta; TEL, telencéfalo; Tál, tálamo; Mes, mesencéfalo; Cb, cerebelo; Romb, rombencéfalo; tne, tracto nigroestriatal; LC, locus coeruleus; VTA, área tegmental ventral.

Figura 2

El siguiente estadio analizado fue E18.5 en cortes sagitales (Fig 2. A-D) con marcaje para TH (Fig 2. A y C) y para RFP (Fig. 2. B y D). Pudimos observar que la Sustancia negra pars compacta, área tegmental ventral y tracto nigroestriatal aparecen positivas para ambos marcajes. De nuevo aparecen poblaciones dopaminérgicas en el tálamo que no son positivas para DAT (Comparar Fig 2. A y B). Se puede observar marcaje positivo para TH en el locus coeruleus pero el marcaje de TH en ese área pertenece a neuronas noradrenérgicas (Comparar Fig 2. C y D). Por último se observa la formación de poblaciones dopaminérgicas en el bulbo olfatorio. Una posible explicación por la que DAT aún no ha aparecido es porque aún no necesitan transportador de dopamina ya que aún no han comenzado a ejercer su función sináptica.

Observando cortes en el plano coronal del mismo estadio (Fig. 2 E-H) con marcaje para TH (Fig. 2E y G) y RFP (Fig. 2F y H) se observó de nuevo que en el tracto nigroestriatal aparecían proyecciones para ambos marcajes. A su vez, se observan de nuevo diferentes áreas del tálamo que aparecen positivas para TH, pero no para DAT. (comparar Fig 2. E y F). En una porción más caudal del mesencéfalo se observó que la sustancia negra pars compacta aparecen positivas para ambos marcajes, con la diferencia de que apenas hay densidad de población de DAT en la parte central del área tegmental ventral y el ventrículo. Esto nos lleva a suponer que las poblaciones presentes no son dopaminérgicas, aunque sean TH positivas (comparar Fig 2. G y H).

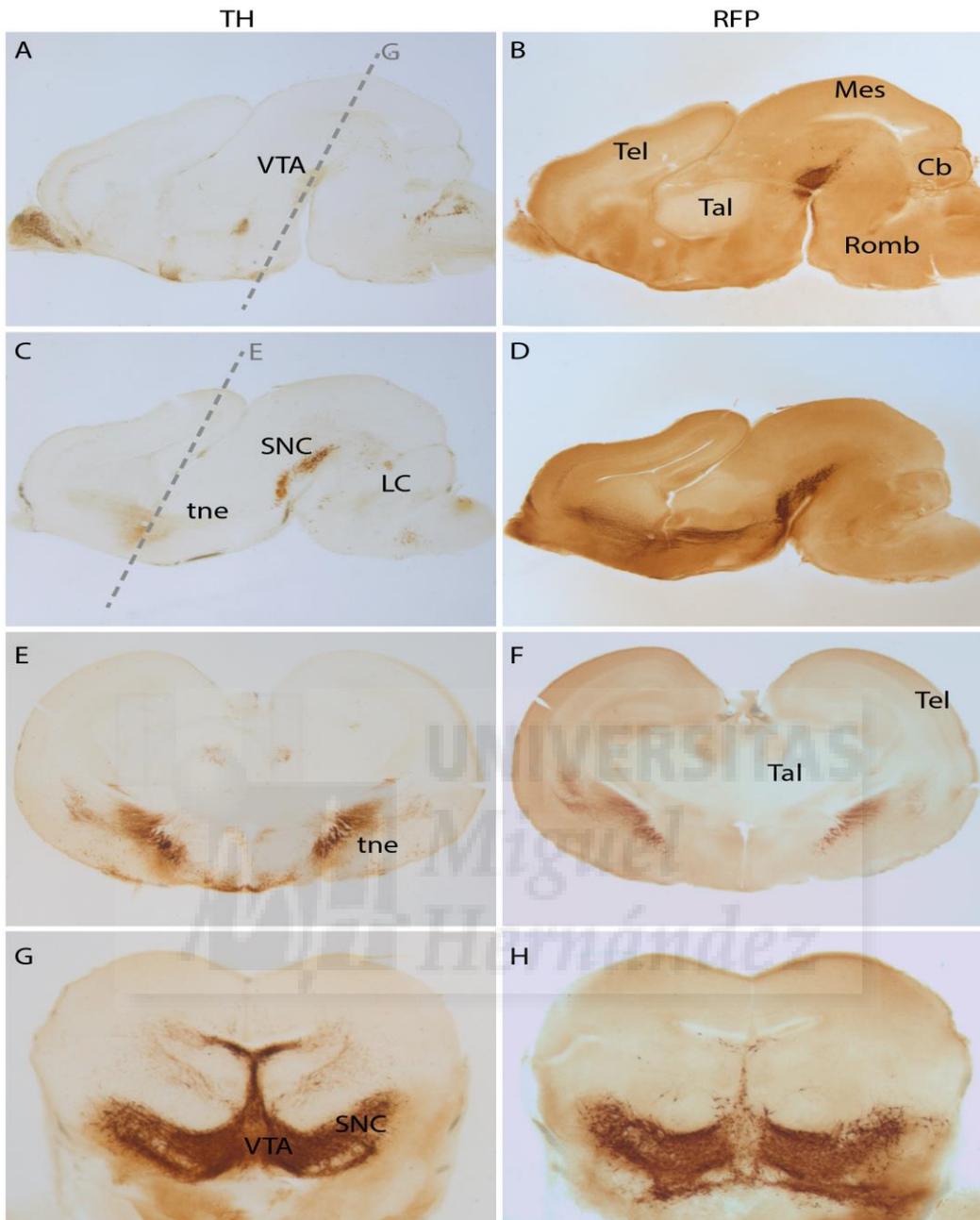


Figura 2: Cortes sagitales (Fig 2. A-D) y coronales (Fig 2. E-H) de dos embriones de estadio E 18.5 a los que se les han aplicado técnicas de inmunohistoquímica: TH para A, C, E y G, RFP para B, D, F y H. **Fig 1A y 1C:** Representación mediante línea discontinua gris de la situación en plano sagital de los cortes G y E respectivamente. **Abreviaturas:** VTA, área tegmental ventral; Tel, telencéfalo; Tal, tálamo; Mes, mesencéfalo; Cb, cerebelo; Romb, rombencéfalo; SNC, sustancia negra pars compacta; tne, tracto nigroestriatal; LC, locus coeruleus.

Figura 3

El primer estadio postnatal corresponde a un embrión P18 en cortes sagitales (Fig 3. A-D) con marcaje para TH (Fig 3. A y C) y marcaje para RFP (Fig 3. B y D) . Se observó de nuevo el área tegmental ventral positivo para ambos marcajes. En este estadio se puede observar el bulbo olfatorio positivo para ambos marcajes, debido a que la dopamina ya ha comenzado a ejercer su función, y por tanto hay presencia de DAT. El tracto olfatorio aparece también positivo para ambos marcajes. Se observa que en el tálamo de nuevo hay poblaciones positivas para TH pero no para DAT. Sorprendentemente se encuentra que en el rombencéfalo hay marcaje positivo para DAT en diversas áreas y no para TH, y por tanto es una zona donde DAT está ejerciendo su función, pero no hay presencia de neuronas dopaminérgicas (comparar Fig 3. A y B).

Se observa además la masiva invasión de la sustancia negra pars compacta al estriado y por tanto aparece completamente marcado. El hecho curioso es que no aparecen neuronas marcadas en ese área, sino que son los axones que llegan en gran magnitud.

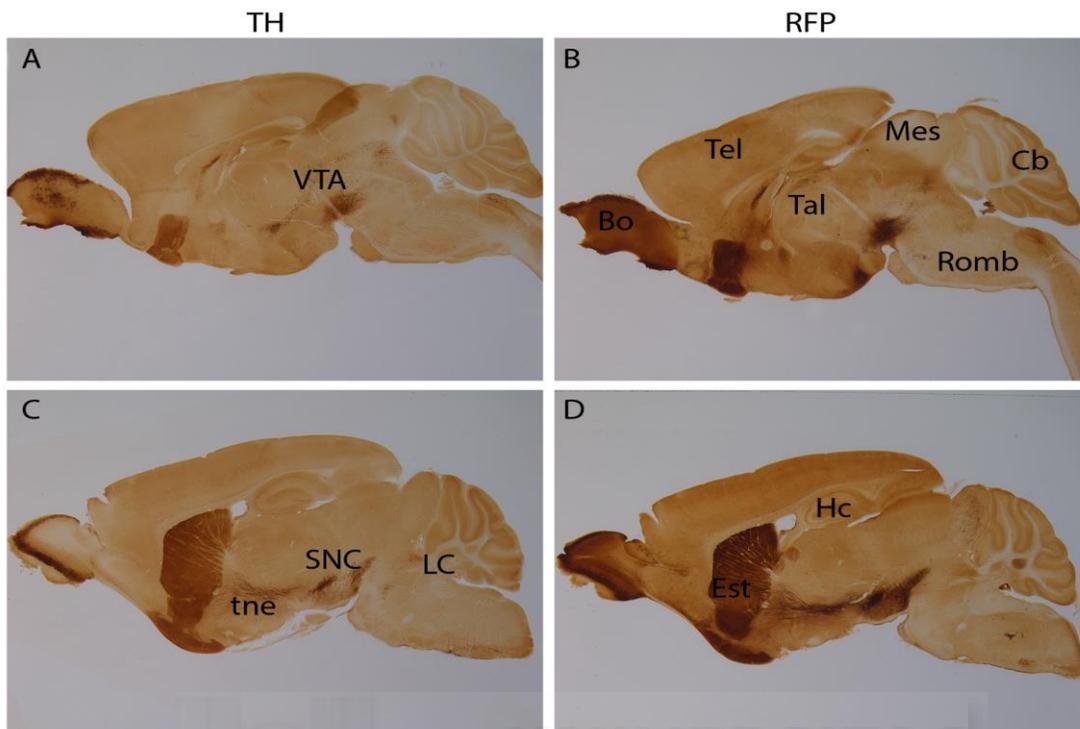
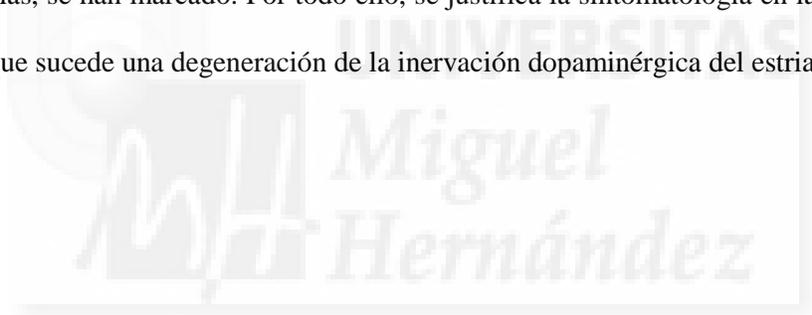


Figura 3: Cortes sagitales de dos embriones postnatales P18 a los que se les ha realizado diferentes técnicas inmunohistoquímicas: TH para A y C, RFP para B y D. **Abreviaturas:** VTA, área tegmental ventral; Bo, bulbo olfatorio; Tel, telencéfalo; Tal, tálamo; Mes, mesencéfalo; Cb, cerebelo; Romb, rombencéfalo; SNC, sustancia negra pars compacta; tne, tracto nigroestriatal; LC, locus coeruleus; Est, estriado; Hc, Hipocampo.

Figura 4

El último estadio observado corresponde a P21 en cortes sagitales (Fig 4. A-D) positivos para TH (Fig 4. A y C) y positivos para RFP (Fig 4. B y D). Se observa de nuevo el área tegmental ventral y bulbo olfatorio positivos para ambos marcajes. Se observaron también poblaciones positivas para TH en el tálamo y que no lo son para DAT. De nuevo se vuelven a encontrar en el rombencéfalo poblaciones que son positivas para DAT, pero no lo son para TH. (comparar Fig 4. A y B).

Se vuelve a observar la gran inervación del haz de fibras desde la sustancia negra pars compacta hacia el estriado tiñéndose por completo. De nuevo cabe resaltar que lo que se observa en este último área son fibras de axones y no neuronas dopaminérgicas pero debido a que hay una gran afluencia de ellas, se han marcado. Por todo ello, se justifica la sintomatología en la enfermedad de Parkinson ya que sucede una degeneración de la inervación dopaminérgica del estriado.



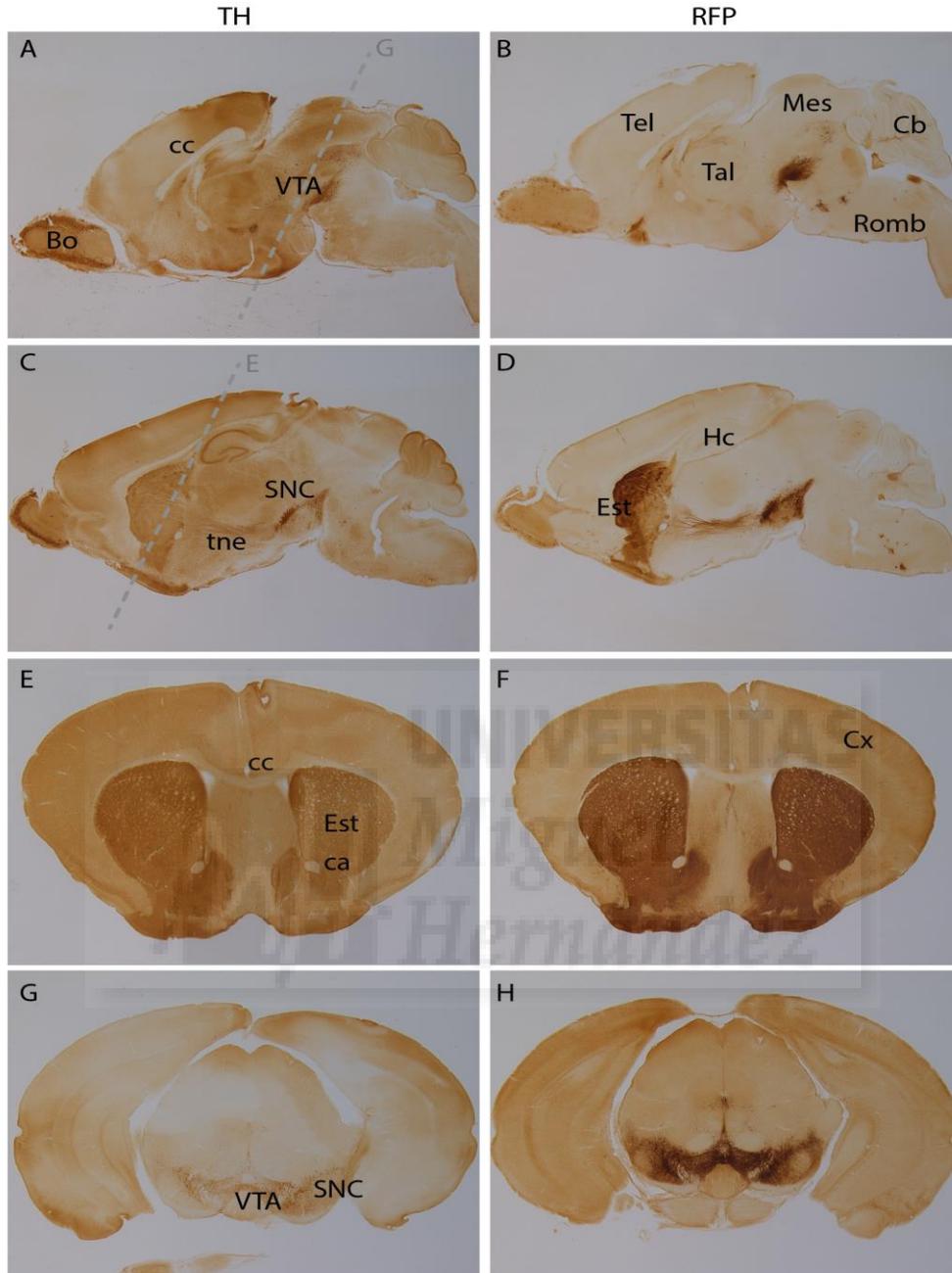


Figura 4: Cortes sagitales (figura 4. A-D) y coronales (figura 4. E-H) de dos embriones postnatales P21 a los que se les han realizado diferentes técnicas inmunohistoquímicas: TH para A,C,E y G, RFP para B, D, F, H. **Fig 4.A y 4. C:** Representación mediante línea discontinua gris de la localización en el plano sagital de los cortes 4.G y 4.E respectivamente. **Abreviaturas:** bo, bulbo olfatorio; cc, cuerpo calloso; VTA, área tegmental ventral; tne, tracto nigroestriatal; Hc, hipocampo; Est, estriado; cc, cuerpo calloso; cx, corteza; SNC, sustancia negra pars compacta; ca, caudado

Figura 5

La observación del bulbo olfatorio en los diferentes estadios estudiados con cortes en orientación sagital (Fig 5. A-H) siendo TH positivos (Fig 5. A, C, E y G) y RFP positivos (Fig 5. B, D, F y H). Para el estadio E15.5 se pudo observar una leve presencia de marcaje TH positivo y la ausencia de marcaje para DAT (comparar Fig 5. A y B). En el estadio 18.5 se observó un amplio marcaje para TH mientras que aún no había presencia de marcaje para DAT (comparar Fig 5. C y D). En el estadio P18 se observó que el bulbo era positivo para ambos marcajes ya que DAT había comenzado a realizar su función y por ello se encontraba presente. Por último, en el estadio P21 sorprendentemente se volvió a observar que aparte de encontrarse el bulbo positivo para ambos marcajes, se encontraron pequeñas poblaciones que eran positivas para DAT pero no para TH y por tanto hacían sospechar que DAT ejercía su función en poblaciones no dopaminérgicas en ese área



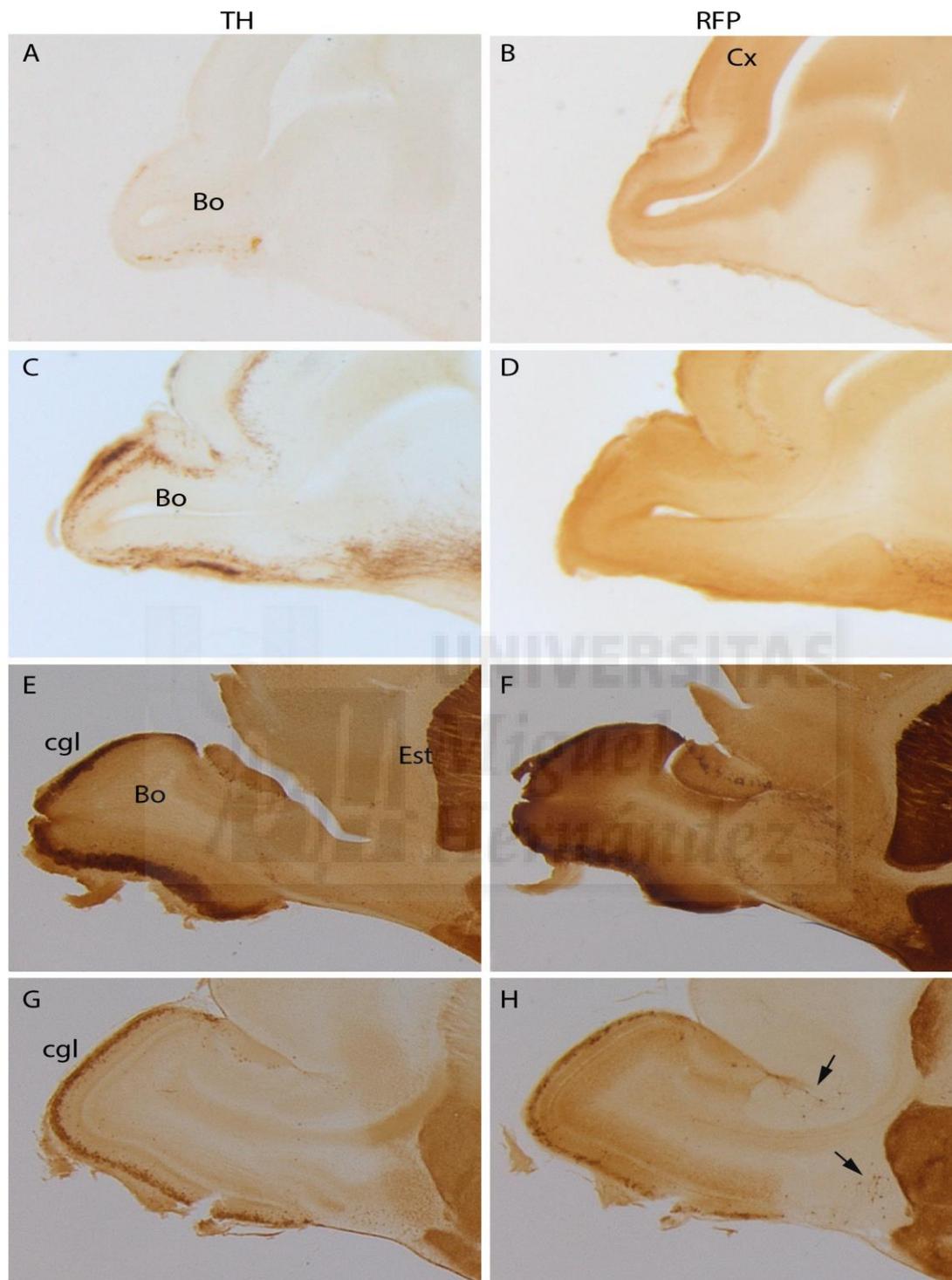
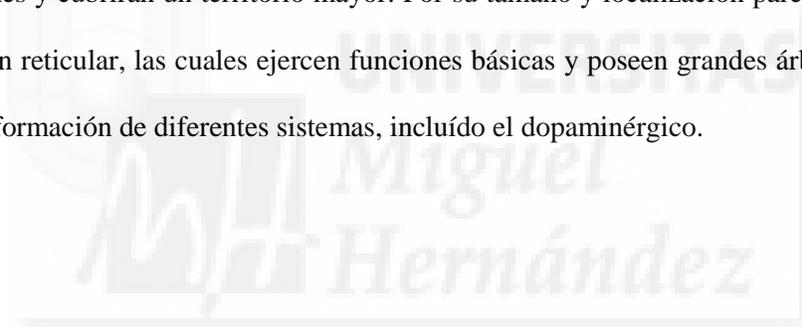


Figura 5: Cortes sagitales del bulbo olfatorio de estadio E 15.5 (Fig 5.A-B) E 18.5 (Fig 5. C-D) P 18 (Fig 5. E-F) P21 (Fig 5. G-H) con técnicas de inmunohistoquímica TH para A, C, E y G, RFP para B, D, F, H. Abreviaturas: Bo, bulbo olfatorio; Cx, corteza; Est, estriado; cgl, glomérulo.

Figura 6

En el estadio P21 se observaron diferentes cortes en orientación sagital (Fig 6. A-F) siendo TH positivos (Fig 6. A, C y E) y RFP positivos (Fig 6. B, D y F). El área tegmental ventral, bulbo olfatorio y tracto olfatorio son positivos para ambos marcajes. (comparar fig 6. A-D). Se pudo observar como el Locus Coeruleus es positivo para TH, pero no para DAT debido a que TH está también presente en poblaciones noradrenérgicas y el Locus Coeruleus es positivo para noradrenalina y no para dopamina. Curiosamente se pueden observar con mayor claridad las zonas del rombencéfalo en las que hay marcaje positivo para DAT, pero no para TH. Es de interés conocer que estas neuronas son de gran tamaño y cuanto más grande es el soma, más grandes serán sus proyecciones y cubrirán un territorio mayor. Por su tamaño y localización parecen ser neuronas de la formación reticular, las cuales ejercen funciones básicas y poseen grandes árboles dendríticos que reciben información de diferentes sistemas, incluido el dopaminérgico.



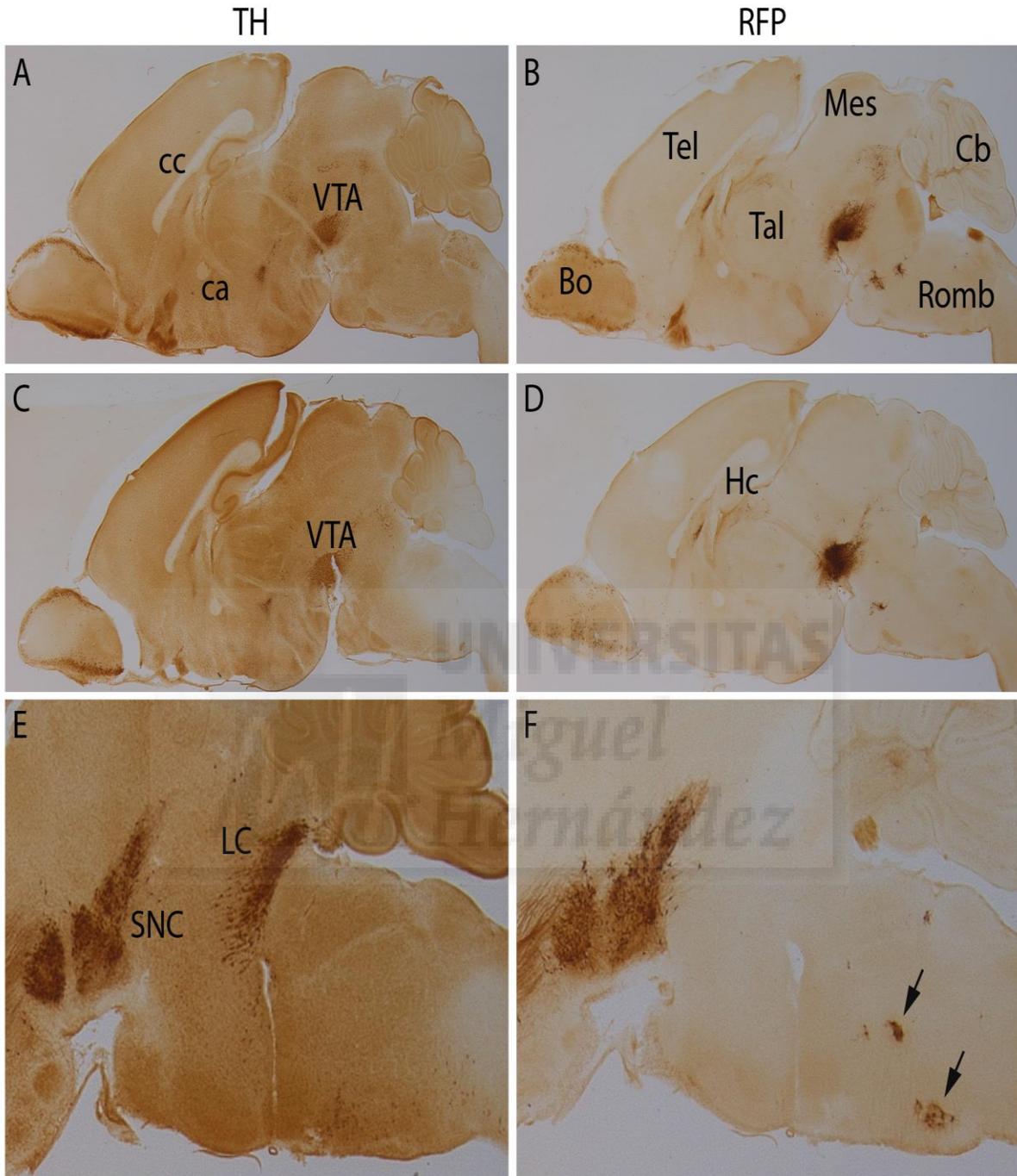


Figura 6: Cortes sagitales procedentes de ratones postnatales P21 a los que se les han realizado diferentes técnicas de inmunohistoquímica: TH para A, C y E, RFP para B, D y F. **Fig 6.F:** Señalización de diferentes poblaciones positivas para DAT pero no para TH. **Abreviaturas:** cc, cuerpo calloso; VTA, área tegmental ventral; ca, caudado; bo, bulbo olfatorio; tel, telencéfalo; tal, tálamo; mes, mesencéfalo; Cb, cerebelo; Romb, rombencéfalo; Hc, hipocampo; LC, locus coeruleus; SNC, sustancia negra pars compacta.

6. DISCUSIÓN

Tras la observación y descripción de los resultados se ha comprobado que DAT, aparte de actuar a nivel presináptico mediante la recaptación de dopamina, se encuentra en otras áreas del sistema nervioso central en las que hay ausencia de neuronas dopaminérgicas, y por tanto actúa a nivel postsináptico con otro tipo de elementos.

La relevancia de esta observación recae en que, hasta la fecha, DAT había sido considerado un elemento presináptico, y por tanto, lo que se conocía era que todos los procesos en los que actuaba o que ejercían una acción en él, ocurrían a solo nivel presináptico y afectando únicamente al sistema dopaminérgico.

Tras conocer este hecho se puede asumir que determinados fármacos o estupefacientes que actúan sobre DAT, posiblemente pueden estar actuando en áreas diferentes en las que no se ha estudiado la influencia y presencia de DAT, y por tanto se plantea la hipótesis de que pueda estar desencadenando un efecto no explorado mediante investigación hasta la fecha.

A su vez, la concentración de DAT es un marcador para la comprobación del desarrollo de enfermedad de Parkinson. Se tomaba como referencia partiendo de la base de que solo actuaba en el sistema dopaminérgico pero si se encuentra en otro área diferente podría generar sesgos como marcador.

Este hecho influye no solo en sustancias que actúen en DAT, sino en la misma regulación de DAT en el sistema nervioso, por lo que podemos objetar que este transportador puede estar realizando funciones aún desconocidas y que pueden abrir otra línea de investigación.

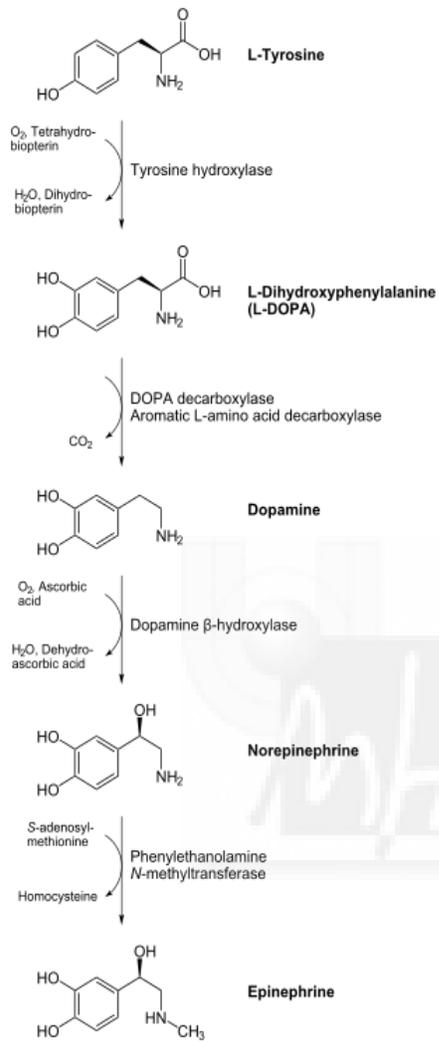
7. CONCLUSIÓN

El transportador de dopamina DAT actúa tanto a nivel presináptico como a nivel postsináptico, por tanto se confirma la hipótesis establecida en este estudio de investigación.



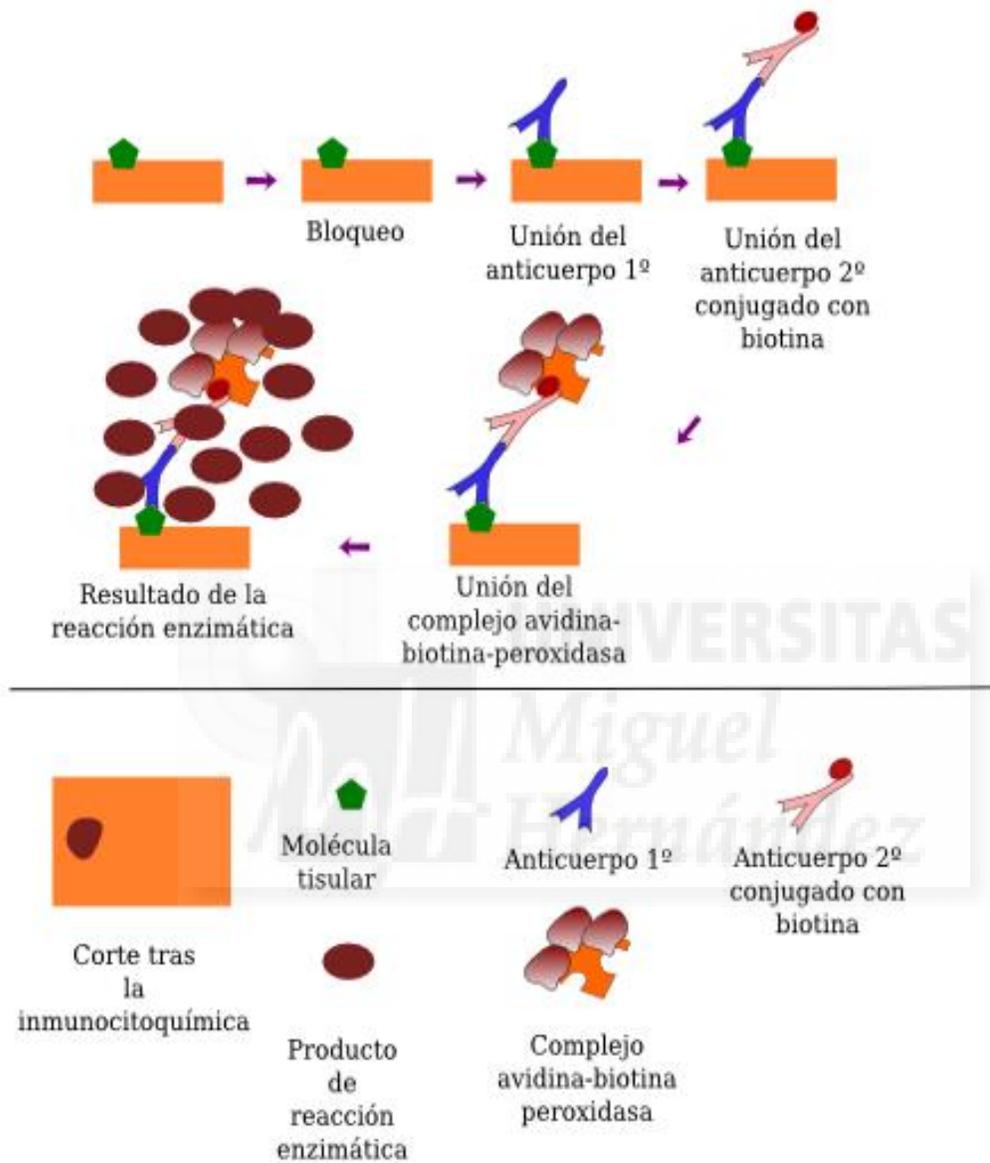
ANEXOS

Imagen 1: Ruta de las catecolaminas



UNIVERSITAS
Miguel
Hernández

Imagen 2: Técnica de inmunohistoquímica



BIBLIOGRAFÍA

1. Zhen Qi, Gary W. Miller, Eberhard O. Voit (2008). *Computational Systems Analysis of Dopamine Metabolism* (artículo completo disponible en inglés). PLoS ONE 3(6): e2444. doi:10.1371/journal.pone.0002444 Último acceso 26 de junio de 2010
2. Purves, D.; Augustine, G. J.; Fitzpatrick, D.; Hall, W. C.; LaMantia, A. S.; McNamara, J. O.; White, L. E., eds. (2008). *Neuroscience* (4th ed.). Sinauer Associates. pp. 137–8. ISBN 978-0-87893-697-7.
3. Zhen Qi, Gary W. Miller, Eberhard O. Voit (2008). *Computational Systems Analysis of Dopamine Metabolism* (artículo completo disponible en inglés). PLoS ONE 3(6): e2444. doi:10.1371/journal.pone.0002444 Último acceso 26 de junio de 2010.
4. . Ciliax BJ, Heilman C, Demschysyn LL. The dopamine transporter: Immunochemical characterization and localization in brain. *J Neurosci*, 15 (1995), pp. 1714-23
5. Hersch SM, Yi H, Heilman CJ, Edwards RH, Levey AI. *Subcellular localization and molecular topology of the dopamine transporter in the striatum and substantia nigra*. *J Comp Neurol*, 388 (1997), pp. 211-27
6. Yang B, Chan RC, Jing J, Li T, Sham P, Chen RY (2007). «A meta-analysis of association studies between the 10-repeat allele of a VNTR polymorphism in the 3'-UTR of dopamine transporter gene and attention deficit hyperactivity disorder». *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* **144** (4): 541-550. doi:10.1002/ajmg.b.30453. PMID 17440978.

7. . Faraone SV, Bonvicini C, Scassellati C. *Biomarkers in the diagnosis of ADHD--promising directions. Current Psychiatry Reports.* 2014;16(11):497.
8. Mateos Fernández, J. (2017). *Estudio de la presinapsis dopaminérgica estriatal con [123I] FP-CIT en pacientes con esquizofrenia y parkinsonismo.* [online] Tdx.cat. Disponible en: <http://www.tdx.cat/handle/10803/2475> [Accessed 25 May 2017].
9. Zhu, J; Reith, MEA (noviembre de 2008). «*Role of dopamine transporter in the action of psychostimulants, nicotine, and other drugs of abuse*» [*Rol del transportador de dopamina en la acción de psicoestimulantes, nicotina y otras drogas de abuso*]. *CNS Neurol Disord Drug*
10. Tejas Juárez, J., Mancilla Díaz, J., Florán Garduño, B. and Escartín Pérez, R. (2017). *Los receptores dopaminérgicos D2/D3 hipotalámicos participan en la regulación del comportamiento alimentario.* [online] Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S018545342010000200005&script=sci_arttext&tlng=pt [Accessed 2 May 2017].
11. Juri, C., Wanner, V. (2016) *Neuroimágenes en enfermedad de parkinson: Rol de la resonancia magnética, el Specto y el Pet.:* Volume 27, Issue 3, May 2016, Pages 380–391. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0716864016300384>