



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA**

**Vía de señalización y papel de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L  
en el control de la liberación de  $[\text{}^3\text{H}]$ -GABA por dímeros  $\text{A}_{2\text{A}}/\text{D}_2$**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**Licenciado en Biología**

**P R E S E N T A:**

**Tania Noemí García Moreno**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**Dr. Benjamín Florán Garduño**



**2015**

**Los Reyes Iztacala, Estado de México**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

可能性 **100%**で生まれたら  
**100%**で生きていくぜ

*(Si nací con un 100% de posibilidades,  
entonces voy a vivir al 100%)*

# AGRADECIMIENTOS

**A mi familia, porque a diario me esfuerzo con el fin de que  
logren estar tan orgullosos de mí como yo lo estoy de ustedes.  
Por ser mi mayor apoyo y el principal motivo para sonreír día a día.**

**GRACIAS!**

*Dr. Benjamín Florán* gracias por darme la oportunidad de participar en un proyecto tan interesante y adentrarme en el camino de la investigación.

*Dr. Sergio Recillas Morales* por guiarme durante el proyecto de una manera amable, muy completa pero sobre todo muy entretenida.

Al *Dr. Jaime Barral* por despertar mi interés en el área de las neurociencias con sus interesantes clases dentro de la facultad.

A mis compañeros de grupo *Salma* y *Ariel* porque su apoyo y compañía hicieron de la licenciatura una etapa muy divertida.

## ÍNDICE

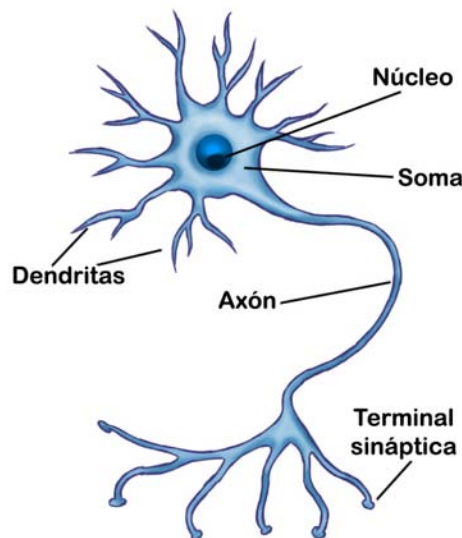
Introducción	6
Receptores acoplados a proteínas G	8
Receptores purinérgicos	10
Receptores purinérgicos A <sub>2A</sub>	11
Receptores dopaminérgicos	13
Receptores dopaminérgicos D2	13
Heteromerización	15
El dímero A <sub>2A</sub> /D2	15
Los ganglios basales	17
La enfermedad de Parkinson	19
Modelos utilizados en el estudio de la enfermedad de Parkinson	20
Antecedentes	22
Justificación	23
Hipótesis	23
Objetivo general	23
Objetivos particulares	23
Material y métodos	24
Material biológico y reserpinización	24
Fármacos y composición del medio	24

Preparación de las rebanadas	24
Liberación de [ <sup>3</sup> H]-GABA	25
Análisis de Datos	25
Resultados	26
Discusión	30
Conclusiones	34
Bibliografía	35

## Vía de señalización y papel de los canales de $\text{Ca}^{2+}$ tipo L en el control de la liberación de [ $^3\text{H}$ ]-GABA por dímeros $\text{A}_{2\text{A}}/\text{D}_2$

### Introducción

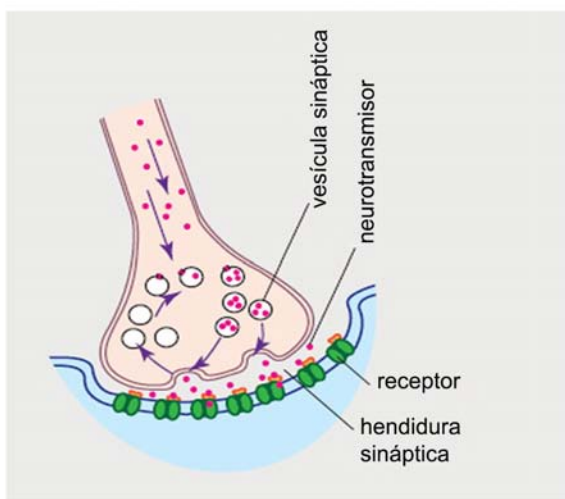
El Sistema Nervioso (SN) está compuesto por redes neuronales que procesan y transmiten información. Este sistema es conformado por dos tipos de células, las neuronas y la glía. Las neuronas son células independientes que, a través de un contacto específico llamado sinapsis, interactúan con cientos o miles de neuronas que se encuentran algunas veces, a gran distancia. A pesar de que las neuronas presentan variedades morfológicas, estas células comparten características que las identifican como neuronas (figura 1). La primera es el cuerpo celular, o *soma*, que contiene al núcleo y el citoplasma circundante (también denominado *perikaryon*). Una de las funciones del soma es asegurar la síntesis de muchos de los componentes requeridos para la función y estructura de la célula; así mismo, el soma recibe numerosos contactos sinápticos de otras neuronas y constituye, junto a las dendritas, la principal área receptiva de las neuronas. Además, una neurona típica posee un axón que, a diferencia de las ramificaciones y espinas presentes en las dendritas, presenta una apariencia lisa y un diámetro uniforme a lo largo de toda su extensión. El axón es el encargado de enviar señales desde la célula hasta otras neuronas o músculos, mediante procesos que son llevados a cabo en las terminales sinápticas localizadas al final de esta estructura (Hammond, 2001; Watson, Kirkcaldie and Paxinos, 2010).



**Figura 1.** El diagrama muestra las estructuras básicas que conforman una neurona. Modificado de Watson, Kirkcaldie & Paxinos, 2010.

Las neuronas son células que han desarrollado la capacidad de liberar moléculas ligadas a la comunicación (Brailowsky, 2009). Son capaces de recibir e integrar información de múltiples estímulos, así mismo, pueden enviar mensajes incluso a regiones muy lejanas del SN. La actividad de una sola neurona en el SN central (SNC) puede ser influenciada por unas diez mil entradas sinápticas. En su mayoría, la comunicación entre neuronas ocurre mediante la liberación de neurotransmisores químicos de las terminales del axón y la detección de estos químicos en la superficie de la membrana celular post-sináptica (Watson, Kirkcaldie and Paxinos, 2010).

Con fines de explicar el proceso que implica la comunicación neuronal, se ha denominado terminación presináptica o axonal a la célula que “envía” la señal y porción post-sináptica a la neurona que recibe la información (Brailowsky, 2009). La sinapsis es la región en la que la comunicación interneuronal toma lugar, los procesos en la sinapsis son activados por potenciales de acción que viajan a través del axón. El potencial de acción provoca la entrada de iones calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) en las terminales neuronales y estos activan la maquinaria celular necesaria para fusionar las vesículas que contienen el neurotransmisor con la membrana presináptica (figura 2). Las moléculas de neurotransmisor son liberadas de la membrana hacia la hendidura sináptica. El neurotransmisor se une y activa uno o más receptores en la membrana post-sináptica. Esta unión es un proceso muy dinámico en el que los transmisores ocupan los sitios de activación durante sólo una fracción de tiempo (milisegundos) mientras están en la hendidura sináptica. Su tiempo de activación es limitado por la acción de enzimas, que degradan al transmisor (Watson, Kirkcaldie and Paxinos, 2010).



**Figura 2. Estructura de la sinapsis.** Este diagrama muestra los componentes básicos de una sinapsis. Las vesículas al interior de la terminal sináptica del axón contienen el neurotransmisor que es liberado hacia la hendidura sináptica. El neurotransmisor se une a los receptores en la membrana de la célula post-sináptica. Modificado de Watson, Kirkcaldie & Paxinos, 2010.

Las neuronas son consideradas células secretoras debido a su capacidad de señalizar mediante la secreción de agentes químicos, denominados neurotransmisores (Hammond, 2001); sin embargo, la definición de una sustancia neurotransmisora es todavía una tarea difícil. Para que una sustancia pueda considerarse un transmisor, esta debería ser liberada

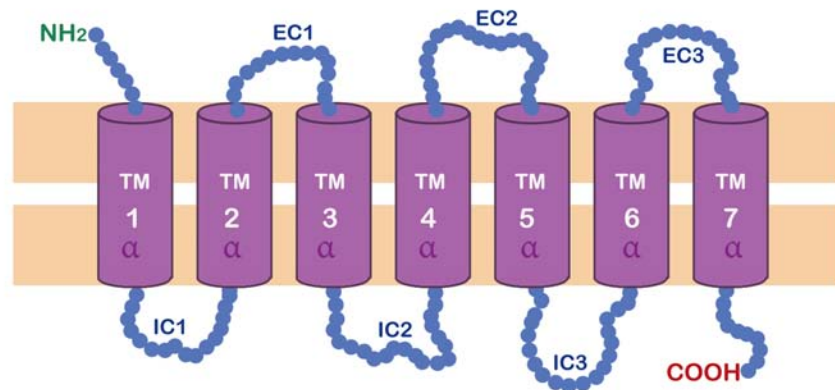


bajo condiciones controladas desde compartimientos en la terminal del axón (o algún otro sitio especializado de la célula). Un criterio adicional es la presencia de enzimas sintetizadoras y vesículas para almacenamiento en el interior de la célula, así como la presencia de receptores específicos y sus respectivos mecanismos de activación (Zimmermann, 1993).

La liberación de neurotransmisor actúa sobre dos tipos de receptores en la célula post-sináptica. El primero es ionotrópico, en el cual la activación de un receptor permite el paso de iones a través de la membrana. El segundo es metabotrópico, en este, al ser activado, el receptor desencadena una cascada de señalización bioquímica dentro de la célula (Watson, Kirkcaldie and Paxinos, 2010).

### Receptores acoplados a proteínas G

Dentro de los receptores metabotrópicos presentes en las neuronas del SN se conoce una variedad de receptores de la superficie celular que median sus acciones intracelulares a través de una vía que involucra la activación de proteínas reguladas por unión a nucleótidos de guanina (Proteína G), por lo que se les denomina receptores acoplados a proteínas G o GPCR, por sus siglas en inglés. La clonación y determinación de secuencias de más de 100 miembros de esta gran familia de receptores muestran que los siete segmentos hidrofóbicos, embebidos en la membrana celular, se conforman de entre 20-25 aminoácidos mismos que están predispuestos a formar  $\alpha$ -hélices transmembranales conectadas mediante asas intracelulares y extracelulares alternadas (figura 3) (Strader *et al.*, 1994). La longitud y flexibilidad de estas asas es de vital importancia para dar pie a diferentes conformaciones tridimensionales del receptor, y por tanto, dotarlo de una plasticidad estructural que le permita interactuar tanto con su ligando como con otros receptores (Agnati *et al.*, 2008).



**Figura 3. Estructura general de un receptor acoplado a proteínas G.** Representación esquemática de la arquitectura típica de siete pases transmembranales de una GPCR. Pase transmembranal (TM), asa intracelular (IC), asa extracelular (EC). Modificado de Agnati *et al.*, 2008.

Además de compartir secuencias de aminoácidos primarios similares y una arquitectura común de siete dominios transmembranales, los receptores acoplados a proteínas G también se caracterizan por la habilidad de modular el metabolismo intracelular a través de la activación de proteínas heterotriméricas de unión a GTP (Gainetdivov *et al.*, 2004). Las proteínas G son una familia de proteínas heterotriméricas, que se conforman de tres subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . Actualmente, estas proteínas se agrupan de acuerdo a la subunidad  $\alpha$ , debido a que se tiene como la subunidad más activa. La clasificación de proteínas  $G_\alpha$  se divide en cuatro subtipos:  $G_{as}$ ,  $G_{aq}$ ,  $G_{ai}$  y  $G_{a12}$  (Gorwood and Hamon, 2006).

La familia de proteínas  $G_{as}$ , o estimulatorias, se subdivide en las proteínas  $G_{as}$  y  $G_{aolf}$ , con sus variantes larga ( $G_{as-L}$ ) y corta ( $G_{as-S}$ ) originadas mediante *splicing* de las proteínas  $G_{as}$  (Gorwood and Hamon, 2006). Ambas familias proteicas son capaces de activar a la adenilato ciclasa (AC) para incrementar los niveles intracelulares de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) (Simon, Strathmann and Gautam, 1991).

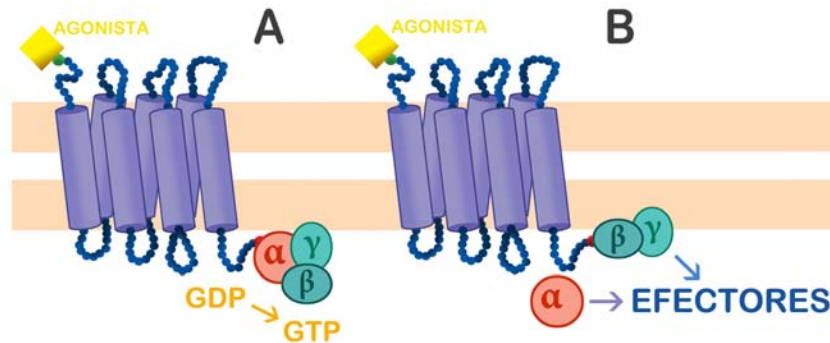
La familia de proteínas  $G_{ai}$ , también conocidas como inhibitorias, se componen de los subtipos  $G_{ai-1}$ ,  $G_{ai-2}$ ,  $G_{ai-3}$ ,  $G_{az}$ ,  $G_{ao-1}$ ,  $G_{ao-2}$  y  $G_{at}$ . Los miembros del subtipo  $G_{ai}$  inhiben la actividad de la AC y también mantienen abiertos los canales iónicos de  $K^+$  (Gorwood and Hamon, 2006), por otro lado, se ha sugerido que la activación de proteínas  $G_{ao}$  produce un incremento de la liberación de fosfoinositidos, a través de su vía de señalización característica (Simon, Strathmann and Gautam, 1991).

Por su parte, las proteínas del tipo  $G_{aq}$  se subdividen en  $G_{aq}$ ,  $G_{a11}$ ,  $G_{a14}$ ,  $G_{a15}$  y  $G_{a16}$  y se sabe que todos los miembros de este grupo proteico activan a la fosfolipasa C (PLC, por sus siglas en inglés) (Gorwood and Hamon, 2006).

Las subunidades  $G_\beta$  y  $G_\gamma$  forman una estrecha asociación entre sí y suelen encontrarse como dímeros. Las proteínas  $G_{\beta\gamma}$  son capaces de regular actividad enzimática, como la activación de la fosfolipasa  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>, por sus siglas en inglés), PLC; inhibir la AC tipo I, activar la AC tipo II y IV; activar canales de  $K^+$ ; y regular la inhibición de canales de  $Ca^{2+}$  mediante proteínas del tipo  $G_{\beta1}$  y  $G_{\beta3}$ . Con 7 isoformas de proteínas  $G_\beta$ , 11 isoformas de  $G_\gamma$  y más de una docena de isoformas de  $G_\alpha$ , existen numerosas combinaciones de proteínas G triméricas que pueden originarse en la célula (Gorwood and Hamon, 2006).

El proceso de señalización (figura 4) se inicia cuando el ligando o agonista adecuado se une al receptor sobre la superficie celular, el dominio intracelular de los receptores cambia su conformación y esto da como resultado un estado del receptor que actúa como factor de cambio para la proteína heterotrimérica de unión a nucleótidos de guanina (Proteína G). El receptor activado facilita la liberación de GDP de la proteína G inactiva, así mismo, se une un GTP para activar a la proteína G. Una vez activada, la proteína G sus tres subunidades se disocian en dos, la subunidad  $\alpha$  por un lado y por otra parte el complejo  $\beta\gamma$ , y cada una se encarga de continuar la señalización mediante diferentes efectores (Premont and Gainetdinov, 2007). Con la hidrólisis de GTP, la subunidad  $\alpha$  unida a GDP y la subunidad

$\beta\gamma$  se re-asocian formando de nuevo una proteína G inactiva provocando el cese de la actividad en las enzimas efectoras (Gainetdinov *et al.*, 2004).



**Figura 4. Activación de un GPCR.** (A) La unión de un agonista en la superficie celular del GPCR activa al receptor, provocando un cambio estructural que facilita la liberación de GDP y estimula el acople de GTP a la subunidad  $\alpha$ . (B) Esta unión activa la subunidad  $\alpha$  provocando la disociación del complejo  $\beta\gamma$ . Modificado Gainetdinov *et al.*, 2004.

Actualmente, sabemos que existen receptores acoplados a proteínas G para muchas moléculas biológicas activas como son las aminas (dopamina, noradrenalina, serotonina, histamina), aminoácidos transmisores (glutamato, GABA) y péptidos (opioides, taquicininas, neurotensinas y muchos factores de liberación endócrina), entre otras. Asimismo, estos receptores se encargan de mediar una gran variedad de eventos fisiológicos a través del cuerpo, desde el reconocimiento quimio-sensorial (visión, olfato y gusto) hasta la regulación endocrina de eventos complejos del comportamiento (Gainetdinov *et al.*, 2004).

## Receptores Purinérgicos

A pesar de que el término neurotransmisor suele utilizarse muy comúnmente para referirse a este compuesto, la adenosina no es una molécula transmisora que se encuentre almacenada en vesículas para luego ser liberada tras la activación de las células nerviosas, como lo hacen el resto de los neurotransmisores. En su lugar, esta puede ser liberada de cualquier célula cuando la concentración intracelular aumenta debido a un incremento en la formación del nucleósido, o bien, puede ser formado rápidamente a partir de la liberación local de ATP (Fredholm *et al.*, 2000), a diferencia de otros neurotransmisores que requieren de neuronas especializadas para su liberación. Además, en cuestiones de fisiología celular, la adenosina presenta numerosas acciones que podrían ser consideradas neuromoduladoras más que neurotransmisoras (Dunwiddie and Masino, 2001), por lo que suele utilizarse el término neuromodulador para referirse a esta molécula.

La adenosina controla muchas funciones cerebrales tanto en condiciones fisiológicas como patológicas mediante la activación de los receptores de alta afinidad,  $A_1$  o  $A_{2A}$ , los de baja afinidad,  $A_{2B}$ , o los de baja abundancia,  $A_3$ . La capacidad de acople de estos subtipos de receptores purinérgicos tanto a proteínas G inhibitorias ( $A_1$ ,  $A_3$ ) como estimulatorias ( $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$ ), así como su amplia distribución espacial en el cerebro, proveen a estos receptores la capacidad de modular a otros neurotransmisores (Boison, 2008). Esta función moduladora dentro del SNC se lleva a cabo a través de una variedad de mecanismos mediados por receptores que implican a sistemas de segundos mensajeros, flujos de iones y modulación de la liberación de transmisor (Barraco *et al.*, 1994). Debido a que las fuentes de adenosina son muy numerosas, para mantener en equilibrio las concentraciones de este compuesto se recurre al uso de transportadores (Fredholm *et al.*, 2007).

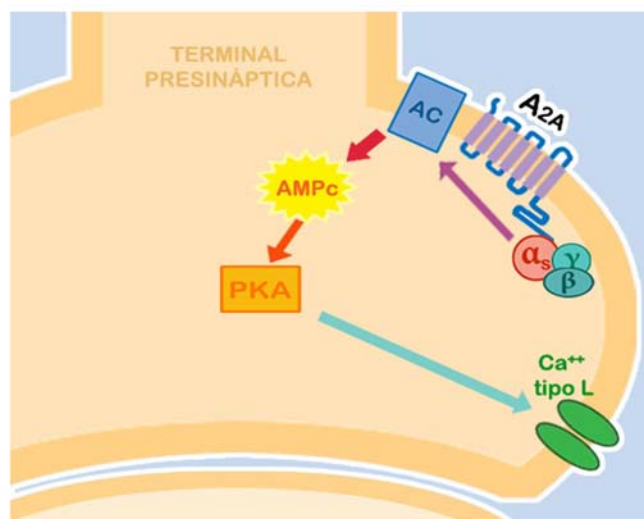
### **Receptores purinérgicos $A_{2A}$ (R- $A_{2A}$ ).**

Al igual que el resto de los receptores purinérgicos, los receptores  $A_{2A}$  pertenecen a la super familia de receptores de 7 pases transmembrana acoplados a proteínas G (Hurley, Mash & Jenner, 2000). En cuanto a su distribución, se ha demostrado que el RNAm de los receptores  $A_{2A}$  es altamente expresado en áreas ricas en dopamina, tales como núcleo caudado, putamen, núcleo accumbens y tubérculo olfatorio de humano, mono, perro, rata y ratón. De hecho, en conjunto, varios estudios muestran que los receptores  $A_{2A}$  están principalmente expresados en estriado y, en cierta medida, también se expresan en las terminales nerviosas que hacen contacto con el globo pálido externo (Svenningsson *et al.*, 1999).

Una de las principales características de este tipo de receptores es su largo dominio carboxilo-terminal, que está compuesto de aproximadamente 120 aminoácidos de los cuales 20 se disponen al interior de la membrana, formando uno de los pases transmembrana, y los 100 aminoácidos restantes son utilizados para el acople de ligandos o proteínas G (Gsandtner and Freissmuth, 2006). Debido a su importancia en la interacción con otras moléculas, se ha sugerido que el dominio C-terminal de los receptores  $A_{2A}$  podría estar jugando un papel crítico en la determinación del nivel funcional del receptor (Fredholm *et al.*, 2007).

La vía de transducción de señales que conlleva la activación de los receptores  $A_{2A}$  aún no se ha comprendido por completo, pero se les ve principalmente ligados al acople de la vía  $G_{s/olf}$ -AC-PKA (Fresco, Diniz and Gonçalves, 2004) (figura 5). El acople a una proteína  $G_s$  activa la AC y provoca la generación de AMPc, facilitando la liberación de neurotransmisor en las terminales mediante la activación de la proteína cinasa A (PKA) (Dunwiddie and Masino, 2001; Fredholm *et al.*, 2007). Sin embargo, se ha encontrado evidencia de que los

receptores  $A_{2A}$  pueden acoplarse a diferentes proteínas G dependiendo de la región anatómica donde estén localizados (Fredholm *et al.*, 2000).



**Figura 5. Señalización del receptor  $A_{2A}$ .** Al activarse el R- $A_{2A}$  la proteína G trimérica se disocia en dos subunidades. La subunidad  $\alpha_s$  promueve la vía de señalización AC-PKA, misma que podría estar activando los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L. Modificado de Fredholm *et al.*, 2007

Además de la generalmente aceptada vía de señalización que implica el acople a proteínas G del tipo estimuladora, los receptores  $A_{2A}$  se han visto involucrados en el acople a otros tipos de proteínas G<sub>s</sub> ( $G_{olf}$ ,  $G_{15/16}$ ) y G<sub>i</sub>. También se sugirió que los receptores  $A_{2A}$ , que se expresan en la arteria de la cola de rata, podrían estar utilizando otras vías de traducción vinculadas a la vía PLC-PKC, debido a que el uso de un bloqueador de la PLC (U-73122) inhibió el efecto que la activación de estos receptores presentan sobre la liberación de noradrenalina, mediante el uso del agonista específico (CGS-21680) (Fresco, Diniz and Gonçaves, 2004).

Los R- $A_{2A}$  han presentado muestras de formación de heterodímeros, tanto con el mismo tipo de receptor ( $A_1/A_{2A}$ ) como con receptores de otros neurotransmisores ( $A_{2A}/D_2$ ) (Boison, 2008). Además de esta habilidad para dimerizar con los receptores D2, se ha demostrado que los receptores  $A_{2A}$  están coexpresados con los receptores a glutamato metabotrópicos del tipo 5 (mGluR5) tanto en células cotransfectadas como en tejido estriatal, mismos receptores con los que también podrían estar estableciendo una relación dimérica (Ferré et al., 2007).

Estudios iniciales sobre los receptores  $A_{2A}$  indicaron la existencia de heterodímeros en el estriado, más adelante se encontró la existencia de los dímeros  $A_{2A}/D_3$  y  $A_{2A}/D_4$ , también en el estriado. En años recientes, se ha obtenido información sobre interacciones triméricas que implican la participación de estos receptores purinérgicos, tales como las interacciones  $A_{2A}/CB1/D_2$  y  $A_{2A}/D_2/mGluR5$  (Fuxe *et al.*, 2010).

## Receptores Dopaminérgicos

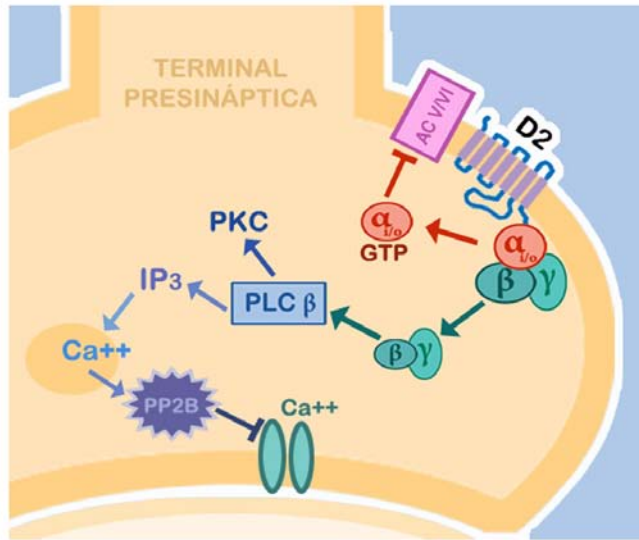
La dopamina (DA) es el neurotransmisor catecolaminérgico predominante en el cerebro de los mamíferos, donde participa en una gran variedad de funciones que incluyen la actividad motora, el aprendizaje, la afectividad, el reforzamiento positivo, la regulación neuroendócrina y la ingestión de alimentos (Missale *et al.*, 1998).

Los receptores a DA pertenecen a la superfamilia de GPCRs por lo que presentan la estructura característica de 7 dominios transmembranales, de 20 a 25 residuos hidrofóbicos, conectados de forma alterna por asas citoplasmáticas y extracelulares y la región amino terminal corresponde a un dominio extracelular glicosilado (Bahena-Trujillo *et al.*, 2000). Existen cinco subtipos de receptores dopaminérgicos presentes en mamíferos mismos que han sido agrupados en dos clases, los de la clase D1 que incluyen a los subtipos D1 y D5, y la clase D2 compuesta por los subtipos D2, D3 y D4. A nivel molecular, muchas de las propiedades de señalización están compartidas entre los subtipos dentro de una clase; la similitud en la vía de transducción de señales es uno de los criterios mediante los que los receptores son agrupados en las diferentes clases (Neve, Seamans and Trantham-Davidson, 2004).

### Receptores dopaminérgicos D2 (R-D2)

Además de la ya mencionada cito-arquitectura típica de 7 pases transmembrana y el acople a proteínas G triméricas, en los receptores dopaminérgicos D2 puede observarse una tercera asa intracelular muy larga, que es una característica común de los receptores que interactúan con proteínas G del tipo inhibitorio. También, en esta asa, el R-D2 presenta dos isoformas generadas por un proceso de *splicing* o ajuste de la información genética, dando origen a una forma larga (D2<sub>L</sub>) mediante la inserción de 29 aminoácidos en esta asa y a una forma corta (D2<sub>S</sub>) que no aumenta su número de aminoácidos. Debido a que esta asa juega un papel central en el acople del receptor la existencia de un mecanismo de *splicing* a este nivel podría implicar una gran diversidad funcional (Missale *et al.*, 1998).

La primera vía de señalización identificada para estos receptores fue la inhibición de la acumulación de AMPc a través del acople de una proteína G $\alpha_{i/o}$  (figura 6). Como es típico en receptores acoplados a proteínas G $\alpha_{i/o}$ , los receptores D2 modulan otras vías de señalización en adición a la AC, y muchas de estas son reguladas por la subunidad  $\beta\gamma$  que se disocia de la subunidad  $\alpha$  durante la activación de la proteína G inhibitoria. Se ha encontrado que, en neuronas espinosas medianas, los R-D2 activan la Fosfolipasa  $\beta 1$  (PLC $\beta 1$ ), provocando la movilización de calcio intracelular que, a su vez, activa proteínas dependientes de Ca<sup>2+</sup> y finalmente la reducción de las corrientes de Ca<sup>2+</sup> tipo L (Neve, Seamans and Trantham-Davidson, 2004).



**Figura 6. Señalización del receptor D2.** La activación del receptor provoca la disociación de la proteína G. La subunidad  $\alpha_{i/o}$  inhibe la actividad de la AC V/VI. La subunidad  $\beta\gamma$  actúa sobre la PLC  $\beta$  afectando a la PKC y los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L. Modificado de Neve *et al.*, 2004.

Hernández-López y colaboradores (2000), estudiaron la vía de señalización PLC $\beta$ 1- IP<sub>3</sub>- Calcineurina, sobre receptores D2 en neuronas espinosas medianas del estriado. De acuerdo a sus resultados, la activación de los R-D2 reduce las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L. Además, observaron que la manipulación de la AC y los niveles de AMPc no producían ningún cambio sobre el efecto que los receptores D2 ejercen sobre los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L. Esto resulta muy interesante, puesto que sugeriría que el efecto de los R-D2 sobre las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L no requieren de la activación de la AC y por tanto podrían estar utilizando una vía alterna para producir su efecto.

Además de esta diversidad funcional, se sabe que los receptores D2 poseen la capacidad de formar dímeros con otros receptores. En 2007, Rashid y colaboradores proponen la posible formación del dímero D1/D2, sugieren que el efecto sobre la PLC que se ha encontrado en algunos receptores D1 podría deberse a un cambio de acople provocado tras la dimerización con el receptor D2, dado que han demostrado estar coexpresados en algunas regiones anatómicas. De hecho, esta interacción con los receptores D1 ha servido como un indicio de la interacción A<sub>2A</sub>/D2 debido a que los receptores D1 y los A<sub>2A</sub> son muy similares tanto morfológica como funcionalmente. Ambos tienen un largo dominio C-terminal ácido y se acoplan a proteínas G<sub>olf</sub> en estriado. Asimismo, es muy probable que los dos receptores utilicen el mismo epítipo (una serina fosforilada en el C-terminal) para llevar a cabo interacciones físicas con los R-D2 (Ferré *et al.*, 2008).

## Heteromerización

Un receptor heterómero puede ser definido como una molécula compleja formada a partir de distintas moléculas de receptor, ya sea del mismo o diferente neurotransmisor. Sea un heterómero o un homómero, el término implica una interacción física directa entre las moléculas de los receptores y no incluye a receptores enlazados indirectamente por medio de proteínas intermediarias (Ferré *et al.*, 2007). La formación de heterómeros puede ser constitutiva o estimulada por la unión de ligandos, particularmente agonistas, y pueden ser la base de acciones mutuas, tanto inhibitorias como estimulatorias (Neve, Seamans and Trantham-Davidson, 2004). En interacciones de este tipo, inicialmente denominadas “interacciones intramembranales receptor-receptor”, la estimulación de uno de los receptores cambia las características de unión de otro receptor por sus ligandos exógenos o endógenos. Esto implica que la señalización intracelular no esté involucrada y sugiere que algún tipo de interacción alostérica está tomando lugar entre los receptores adyacentes (Ferré *et al.*, 2007).

Se propone que la heteromerización constituye un mecanismo utilizado por los GPCRs para diversificar sus propiedades y función (Woods *et al.*, 2008). En la homomerización y heteromerización de receptores acoplados a proteínas G se ha sugerido que la formación de estos complejos proteicos depende del contacto entre las hélices transmembranales, el intercambio de hélices transmembrana o ligandos entre las asas intracelulares o extracelulares, o bien, mediante una interacción electrostática epitope-epitope, como la que ocurre en el heterómero A<sub>2A</sub>/D2 (Ferré *et al.*, 2004). Asimismo, se sabe que la formación de estos complejos afecta la unión al receptor, el tráfico, el acople a proteínas G y de ese modo la señalización del receptor (Torvinen *et al.*, 2004).

## El dímero A<sub>2A</sub>/D2

Una fuerte interacción entre los receptores A<sub>2A</sub> y D2 en el SNC ha sido documentada repetidamente tanto en estudios bioquímicos como conductuales. Mediante una técnica inmunohistoquímica de hibridación *in situ* se determinó que los receptores D2 se expresan en neuronas estriadopalidales que contienen RNAm de encefalina (Gerfen, 1992). Por otro lado, mediante un estudio doble de hibridación, Svenningsson y colaboradores (1999) encontraron que el RNAm del receptor A<sub>2A</sub> se encuentra co-localizando con el RNAm de los receptores D2 en las neuronas medianas espinosas del estriado dorsal.

En 1993, Ferré y colaboradores realizaron experimentos de microdiálisis en estriado y globo pálido de rata. Ellos observaron que la infusión de un agonista dopaminérgico en el estriado provocaba una considerable disminución en los niveles de GABA extracelular; sin embargo, este mismo tratamiento no tenía efectos al ser inyectado en el globo pálido.



También observaron que la infusión del agonista del receptor A<sub>2A</sub>, CGS 21680 no alteraba los niveles de GABA en ninguno de los dos núcleos, pero al coactivar ambos receptores de producía un aumento en los niveles de GABA extracelular. Estos resultados sugieren que el principal sitio de interacción entre el neurotransmisor DA y el neuromodulador adenosina son las neuronas estriadopalidales.

En 2004, Torvinen y colaboradores, en base a experimentos realizados con receptores quiméricos, sugirieron que el quinto segmento transmembranal y/o la tercera asa intracelular del receptor D2 están involucrados en la interacción del dímero A<sub>2A</sub>/D2 a nivel del reconocimiento del receptor dopaminérgico. Debido a que el efecto característico del agonista de A<sub>2A</sub>-R (CGS-21680) sobre el receptor D2 se perdió al cambiar estos segmentos del receptor.

La revisión de estudios llevados a cabo sobre este dímero (Ferré *et al.*, 2004) sugiere que la formación del dímero A<sub>2A</sub>/D2 podría ser resultados de la interacción electrostática entre los epítomos VLRRRRKRVN (presente en el tercer *loop* intracelular del R-D2) y HELKGVCPPEPGLDDLAQDGAVGS (localizado en el dominio carboxilo terminal del R-A<sub>2A</sub>), aunque también se identificó otro epítipo putativo para esta interacción con el receptor D2, el epítipo SAQEpSQGNT se produce alrededor de una serina y puede ser constitutivamente fosforilado. En cuanto a esta interacción, es importante resaltar que la fosforilación del motivo ácido mediante la caseína quinasa en un receptor deja disponible al motivo básico para otra interacción. Por otra parte, la fosforilación de los residuos de serina y/o treonina del motivo básico, por la PKA o C vuelve lenta la atracción entre los epítomos (Fuxe *et al.*, 2009).

Mediante estudios electrofisiológicos en neuronas espinosas medianas de la vía estriado-palidal, Azdad y colaboradores (2008) demostraron que la activación de los receptores D2 inhibe fuertemente la transición inducida por NMDA a un estado de despolarización con disparo continuo; así mismo, encontraron que la inhibición de la corriente de canales Ca<sub>v</sub>1.3a, mediada por los receptores D2, es el mayor mecanismo molecular para la disminución de la despolarización inducida por NMDA. Además, observaron que la activación de los receptores A<sub>2A</sub> no afecta la despolarización inducida por NMDA por lo que sugirieron que, bajo sus condiciones experimentales, los receptores A<sub>2A</sub> requieren de la estimulación de los receptores D2 para generar una respuesta efectiva. En base a la relación encontrada entre ambos receptores, este grupo de investigadores sugirió que muy posiblemente el receptor A<sub>2A</sub> modula la supresión de la corriente de canales de Ca<sup>2+</sup> tipo L mediada por el receptor D2 a través de una interacción intramembranal receptor- receptor, en la que se verían implicadas las vías de señalización de ambos receptores.

Los efectos en la liberación de neurotransmisor y excitabilidad neuronal son paralelos a los efectos sobre la actividad motora y otras respuestas conductuales, donde los agonistas o antagonistas selectivos del R-A<sub>2A</sub> contrarrestan o potencian, respectivamente, la activación

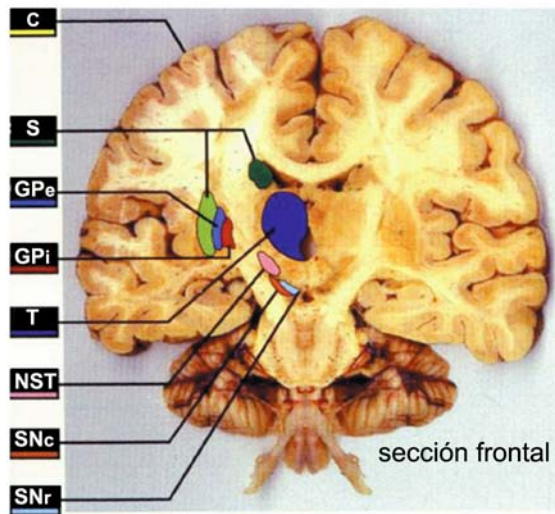
motora generada por los receptores D2 (Ferré *et al.*, 2008). A pesar de que ya se conoce más sobre los mecanismos moleculares y celulares que participan en la actividad y formación de este dímero, las primeras evidencias de la interacción antagonista entre los receptores purinérgicos y dopaminérgicos se obtuvieron a partir de estudios conductuales en modelos de la enfermedad de Parkinson utilizando antagonistas no selectivos para receptores de adenosina (cafeína y teofilamina) en combinación con L-DOPA y agonistas dopaminérgicos, llevando a un incremento en la actividad motora producida por los fármacos dopaminérgicos (Fuxe *et al.*, 2007).

Otros estudios conductuales indican que la estimulación de los receptores D2 mientras se antagoniza a los receptores A<sub>2A</sub> provoca el incremento de la actividad locomotora; en cambio, cuando se antagoniza a los R-D2 y se estimula a los R-A<sub>2A</sub> se disminuye el movimiento. Es así que en la formación del heterodímero A<sub>2A</sub>/D2 los dos mecanismos estarían interactuando y la combinación del uso de agonistas para ambos receptores podría representar una importante estrategia en la disminución de alteraciones motoras (Ferraro *et al.*, 2012).

## **Los ganglios basales (GB)**

Los ganglios basales son un conjunto de núcleos profundos de los hemisferios cerebrales que se conforman por el núcleo caudado y putamen (que en conjunto se denominan estriado (S)), el globo pálido (GP) y el núcleo subtalámico (NST); además se asocian con la sustancia *nigra* (SN), una estructura del cerebro medio que se conecta recíprocamente con dichos núcleos (Bear, Connors & Paradiso, 2007).

En primates y en muchos mamíferos no primates, el estriado es dividido por la cápsula interna en núcleo caudado y putamen. En otras especies de mamíferos, incluyendo rata y ratón, los bordes de la cápsula interna atraviesan el estriado en forma de pincel y no como un plato, por lo que el estriado no se subdivide en dos entidades. De igual modo, el GP, en primates, se observa más pálido que el estriado adyacente al hacerse una tinción de Nissl, y es dividido por la lámina medular interna en un segmento lateral o externo (GPe) y en otro medial o interno (GPi). En mamíferos no primates, las neuronas que conforman el GPi se encuentran completamente rodeadas por fibras de la cápsula interna, esto da lugar al núcleo entopeduncular (NEP), una estructura homóloga al GPi de los primates (Björklund and Hökfelt, 2005) (figura 7).



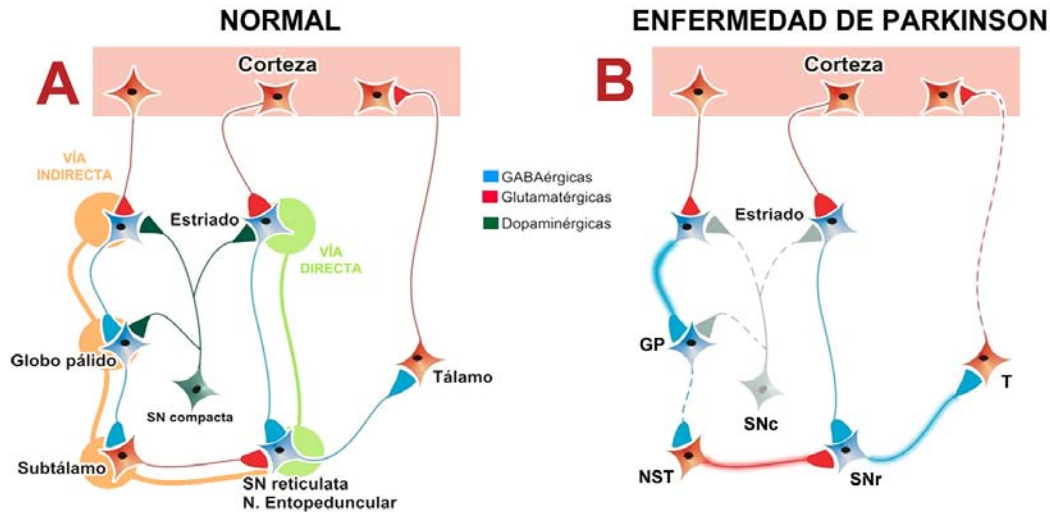
**Figura 7. Ganglios Basales.** Corte coronal del cerebro que muestra a los núcleos que conforman los GB. El corte muestra un ángulo rostro-caudal que permite observar a los núcleos en una sola sección. C, corteza; S, estriado; GPe/GPi, globo pálido externo e interno; T, tálamo; NST, núcleo subtalámico, SNr/SNc substancia nigra *pars compacta* y *reticulata*. Modificado de Obeso *et al.*, 2002.

Los GB forman parte de una compleja red neuronal de circuitos organizados en paralelo para integrar la actividad de diferentes regiones corticales (asociativa, oculomotora, límbica y motora) (Obeso *et al.*, 2002). En términos generales, la información neuronal es canalizada en el estriado, la principal región de entrada a los ganglios basales, a partir de tres principales grupos de aferencias: las vías cortico-estriatal, tálamo-estriatal y nigro-estriatal (Björklund and Hökfelt, 2005).

En el estriado, el principal tipo neuronal son las neuronas espinosas medianas, las cuáles conforman alrededor del 95% de la población neuronal estriatal. Estas neuronas reciben dos principales aferencias, una entrada glutamatérgica cortico-límbico-talámica y una entrada dopaminérgica mesencéfalica, desde la SNc y el área ventral tegmental (AVT). Estas aferencias convergen en las espinas dendríticas, donde el contacto sináptico se da en la cabeza de la espina dendrítica (entrada glutamatérgica) y en el cuello de la misma (entrada dopaminérgica) (Ferré *et al.*, 2008). Aproximadamente la mitad de estas neuronas proyectan hacia la SNr y la otra mitad hacia el GPe dando lugar a dos vías que conectan el estriado con los núcleos de salida (Björklund and Hökfelt, 2005).

La vía directa establece una conexión monosináptica inhibitoria que va del putamen al GPi/SNr (figura 8-A); estas neuronas se caracterizan bioquímicamente por expresar, principalmente, receptores dopaminérgicos D1 y co-expresar a los péptidos sustancia P y dinorfina. Por otro lado, en la vía indirecta, las neuronas envían los axones GABAérgicos hacia la porción externa del globo pálido (GPe), que conecta con el NST para finalmente enviar la señal mediante proyecciones hacia GPi/SNr. A diferencia de las neuronas que señalizan por la vía directa, estas se caracterizan por la expresión de receptores dopaminérgicos del tipo D2, así como la coexpresión del péptido encefalina (Obeso *et al.*, 2000; Obeso *et al.*, 2002).

Los GB proveen un importante sistema neuronal a través del cual la corteza afecta el comportamiento (Gerfen, 1992). De hecho, evidencia reciente sugiere que este conjunto de núcleos no sólo está involucrado en el control del movimiento, sino también en la planeación de la “memoria de trabajo” y emoción (Obeso *et al.*, 2000); sin embargo, el más notable de sus efectos está relacionado al control del movimiento (Gerfen, 1992), de ahí que los estudios sobre estos núcleos continúen enfocándose hacia este rubro.



**Figura 8. El circuito motor de los ganglios basales. (A)** En estado normal, el putamen recibe aferencias de la corteza y se comunica con el GPi/SNr a través de la vía directa, o bien, a través de la vía indirecta multisináptica (GPe, NST). **(B)** En la enfermedad de Parkinson, la deficiencia de DA incrementa la actividad inhibitoria del putamen hacia el GPe y la desinhibición del NST. La hiperactividad de este núcleo produce una excesiva excitación de las neuronas en el GPi/SNr que inhibe la actividad del tálamo y los centros motores en el cerebro. Modificado de Obeso *et al.*, 2002.

## La Enfermedad de Parkinson (EP)

La enfermedad de Parkinson es un padecimiento neurodegenerativo en el que los ganglios basales juegan un papel importante. Esta enfermedad surge como resultado de la degeneración del sistema dopaminérgico presente en este conjunto de núcleos, generando dificultad para iniciar movimientos (Gerfen, 1992). En este arreglo sináptico, la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNc y la consecuente reducción de dopamina llevan a una cascada de modificaciones funcionales en la actividad de este “circuito motor”, lo que resulta en el desarrollo de síntomas motores característicos de este padecimiento. Particularmente, la denervación de DA nigro-estriatal induce un desequilibrio entre la vía directa y la indirecta que se caracteriza principalmente por una sobreactividad de las proyecciones GABAérgicas estriado-palidales, que inducen una excesiva inhibición de la actividad tálamo-cortical (Ferraro *et al.*, 2012).

Dentro de los principales síntomas en la EP tenemos la hipocinesia (falta de movimiento), bradicinesia (lentitud del movimiento), rigidez y temblor en reposo. Mientras están de pie o caminando, los pacientes con EP exhiben una posición fetal característica, el tronco y las rodillas están flexionados. También la longitud de los pasos se ve reducida por lo que el número de estos aumenta y los pacientes parecen impulsarse hacia el frente, hasta que finalmente pierden el equilibrio. La principal característica patológica de esta enfermedad es la pérdida de neuronas mielinizadas en la SNc, esta disminución provoca un marcado déficit del contenido dopaminérgico en el estriado (Obeso *et al.*, 2002). El efecto que la falta de DA produce dentro del circuito de los GB se muestra en la figura 8-B.

Se ha sugerido que el tono dopaminérgico y los circuitos internos en los ganglios basales están diseñados para mantener la estabilidad de la red de control motor, por lo que la reducción de DA, síntoma característico de esta enfermedad, desestabiliza el sistema y lleva a un incremento en la sincronización neuronal y la actividad oscilatoria en muchos de los circuitos de los GB (Obeso *et al.*, 2000). Por tal motivo, en el manejo de los síntomas de la EP se emplean la L-DOPA y agonistas dopaminérgicos, fármacos altamente efectivos para controlar las etapas tempranas de este desorden motor. Sin embargo, el uso de estas sustancias se ha asociado con efectos secundarios agudos y con una serie de complicaciones relacionadas con el tratamiento a largo plazo que incrementan la progresión de la enfermedad.

El comienzo de los síntomas motores de la EP y la ocurrencia de discinesias inducidas por L-DOPA se centran en cambios que ocurren en las vías de señalización del estriado. La atención se ha enfocado de manera importante a la capacidad de los receptores  $A_{2A}$  para modular estas neuronas. En base a la interacción que los receptores  $A_{2A}$  y D2 tienen en las neuronas medianas espinosas del estriado, se ha propuesto un novedoso enfoque terapéutico dirigido a los receptores  $A_{2A}$  y no a sistemas dopaminérgicos (Kase, Mori and Jenner, 2004).

## **Modelos utilizados en el estudio de la enfermedad de Parkinson**

Para estudiar la enfermedad de Parkinson en modelos animales, existen métodos conductuales y por farmacológicos. En el caso de los primeros, debido a que los roedores utilizados como blanco de experimentación no desarrollan EP como tal, suelen utilizarse como referencia las conductas que involucran la función del estriado, como la habituación a un ambiente nuevo o la habilidad para aprender paradigmas estímulo-respuesta. En cuanto a los modelos farmacológicos, dentro de las neurotoxinas empleadas para inducir la degeneración dopaminérgica algunas de las más empleadas son la 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) y la toxina 1-metil-4-fenil-tetrahidropiridina (MPTP) (Dauer & Przedborski, 2003).

La 6-OHDA es una estructura análoga de la DA que presenta un grupo hidroxilo adicional en la posición 6 del anillo de benceno. Esta molécula es un efectivo “caballo trolano”, debido a que es llevada dentro de las neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas mediante canales activos para la recaptura de neurotransmisor y se acumula intraneuronalmente. La 6-OHDA es un compuesto altamente electroactivo, que al oxidarse rápidamente produce peróxido de hidrógeno y radicales libres, lo cuales son altamente citotóxicos. Este compuesto es incapaz de atravesar la barrera hematoencefálica, por lo que debe ser administrado intracerebralmente en ratas adultas. A pesar de que la 6-OHDA es tóxica contra todas las neuronas catecolaminérgicas in vitro, su potencia y selectividad pueden ser aumentadas mediante variaciones farmacológicas y farmacodinámicas en su administración (Björklund and Hökfelt, 2005).

El MPTP es un neurotóxico contaminante que se creó inadvertidamente durante la síntesis de MPPP, en humanos y monos (Dauer and Przedborski, 2003). Por sí mismo no es un compuesto activo pero es convertido enzimáticamente, mediante la monoamino oxidasa (MAO) en el ión metil-fenilpiridinio (MPP<sup>+</sup>, por sus siglas en inglés) en células gliales, convirtiéndose en un compuesto tóxico que aumenta la formación de radicales libres superóxido al interrumpir la producción de ATP en la célula (Björklund and Hökfelt, 2005). El MPTP produce un síndrome parkinsoniano muy severo que incluye gran parte de los síntomas característicos de la enfermedad (Dauer and Przedborski, 2003).

En experimentos pioneros realizados en 1959, sobre la manipulación de la síntesis farmacológica de catecolaminas (dopamina y noradrenalina (NA)) se encontró que al bloquear el almacenamiento de estas moléculas con reserpina se produce una profunda acinesia en ratas y conejos. Esto llevó al descubrimiento de que los síntomas motores están más relacionados con la depleción de DA en el estriado que con la depleción de NA de las áreas primarias de proyección en la corteza, hipocampo e hipotálamo (Björklund and Hökfelt, 2005). A partir de estos hechos, la reserpina se convirtió en un modelo importante para estudiar la EP. Además, este modelo tiene la singularidad de que el estado acinético, provocado por el tratamiento, es aliviado al administrarse L-DOPA, lo que llevó a pensar que los síntomas motores de la EP son resultado de la depleción de DA. A pesar de que este modelo tiene la desventaja de que sus efectos son temporales y no generan cambios morfológicos en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra*, este modelo ha sido utilizado exitosamente para investigar el efecto terapéutico de agentes de sustitución de la dopamina estriatal, incluyendo la L-DOPA y agonistas de los receptores dopaminérgicos (Betarbet, Sherer and Greenamyre, 2002).

## Antecedentes

En 1997, Florán y colaboradores realizaron un estudio de liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA, en ratas reserpinizadas, en donde observaron que la DA endógena ejerce una acción inhibitoria en la liberación de neurotransmisor inducida por despolarización en rebanadas de globo pálido de rata. Mediante experimentos realizados con metanfetamina se observó la disminución de los niveles de liberación provocados por la DA endógena y el uso de un antagonista selectivo para los receptores del tipo D2, Sulpiride, indicó que esta acción inhibitoria está mediada específicamente por este tipo de receptores.

Años más tarde, se estudió la relación antagónica entre los receptores A<sub>2A</sub> y D2 con el fin de determinar si la activación concurrente de los R-D2 es necesaria para la acción de los R-A<sub>2A</sub>. Para ello se utilizaron tanto ratas normales como reserpinizadas. Cuando los niveles de dopamina endógena se redujeron de forma considerable (aproximadamente el 90% del contenido total de DA), mediante el tratamiento con reserpina, la estimulación de la liberación de GABA producida por el agonista del R-A<sub>2A</sub>, CGS 21680, se perdió. Estos resultados sugieren que los efectos terapéuticos de los antagonistas A<sub>2A</sub> podrían ser mayores en la presencia de niveles “modestos” de dopamina, pero cuando la transmisión dopaminérgica es eliminada el efecto de los antagonistas de R-A<sub>2A</sub> estaría ausente. En otras palabras, este estudio nos demuestra que los receptores A<sub>2A</sub> necesitan ser co-activados junto con los receptores D2 para ejercer su acción moduladora y así provocar un cambio sobre niveles de liberación de neurotransmisor (Florán *et al.*, 2005).

Más recientemente, Recillas y colaboradores (2012) se dieron a la tarea de determinar la posible vía de señalización por la que el dímero A<sub>2A</sub>/D2 se encuentra señalizando en ratas no reserpinizadas. En base a una serie de maniobras farmacológicas en experimentos de liberación de [3H]-GABA, este grupo de investigadores logro descartar la participación de proteínas G<sub>s</sub>, al bloquear la vía PKA con H-89, y G<sub>i</sub>, bloqueando el acople mediante el uso de N-etilmaleimida (NEM), en el proceso de señalización de este dímero. Por otra parte, y bajo las mismas condiciones, emplearon un bloqueador de la PLC, el fármaco U-73122, para determinar que la vía de señalización del heterómero depende de un acople a proteínas G<sub>q/11</sub> y, por tanto, activa la cascada de señalización PLC-IP<sub>3</sub>/DAG.

## **Justificación**

Dada la importancia de la relación heteromérica entre los receptores  $A_{2A}$  y D2 en el origen y la mejora de trastornos motores, así como los cambios que la formación de un dímero conlleva tras su formación, se ha vuelto necesario comprender la forma en que estos complejos proteicos llevan a cabo su señalización debido a que el conocimiento a fondo de su actividad facilitaría el entendimiento del sistema y, por lo tanto, nos permitiría sentar las bases para crear terapias de apoyo para el tratamiento de enfermedades relacionadas con este dímero, tal es el caso de la enfermedad de Parkinson. Pues si bien la actividad de estos receptores se tienen registradas bajo condiciones normales, así como en distintos modelos animales, es un hecho que la actividad del dímero  $A_{2A}/D2$  no está del todo clara bajo condiciones similares a las que provocaría la enfermedad de Parkinson, es decir, aún no es posible comprender en qué forma la falta de dopamina afecta el funcionamiento de este complejo proteico.

## **Hipótesis:**

La coactivación de los receptores  $A_{2A}$  y D2, en neuronas estriado-palidales de ratas reserpinizadas, activará la vía de señalización AC-PKA.

## **Objetivo General**

Estudiar la vía de señalización y el papel de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L en el control de la liberación de [ $^3H$ ]-GABA al activar el dímero  $A_{2A}/D2$  en globo pálido de ratas reserpinizadas.

## **Objetivos Particulares**

- Determinar si al coactivar los receptores  $A_{2A}$  y D2, en globo pálido de rata reserpinizada, estos señalizan por medio de la vía AC-PKA ó mediante la vía PLC- $IP_3/DAG$ .
- Determinar si la actividad de los canales de  $Ca^{++}$  tipo L están implicados en el proceso de señalización del dímero  $A_{2A}/D2$ .



## Material y Métodos

### Material biológico y reserpización

Por cada serie de los diferentes experimentos se utilizaron 10 ratas macho de la cepa Wistar, con un peso de entre 180- 220 g. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Uso y Cuidado Animal del CINVESTAV, IPN y concuerdan con la Guía de Salud de los Institutos Nacionales para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. Asimismo, los experimentos fueron diseñados con el fin de minimizar el número de animales necesarios.

Se preparo una solución de reserpina a una concentración de 10 mg/ml, con ácido láctico y agua. Con el fin de agilizar el proceso de dilución se utilizó un sonicador (Ultrasonic LC30H). Para depletar la dopamina endógena, a cada una de las ratas se les aplico una inyección subcutánea de reserpina (10 mg/kg) 16 horas antes del experimento.

### Fármacos y composición del medio

Los fármacos utilizados en las diferentes series experimentales fueron los siguientes: Quinpirol (10  $\mu$ M), agonista de los receptores D2-like; Sulpiride (10  $\mu$ M), antagonista selectivo de los R-D2; CGS 21680 (10  $\mu$ M), agonista selectivo R-A<sub>2A</sub>; CSC (10  $\mu$ M), antagonista selectivo A<sub>2A</sub>; H-89 (10  $\mu$ M), bloqueador de la PKA; U-73122 (10  $\mu$ M), inhibidor de la PLC; Nifedipino (10  $\mu$ M), bloqueador de los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo L.

La composición del medio Krebs-Henseleit (KH) modificado fue la siguiente (mM): NaCl, 134; KCl, 5; CaCl, 2; MgSO<sub>4</sub>, 1; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.25; NaHCO<sub>3</sub>, 25; Dextrosa, 10; ácido aminooxiacético, 0.01. El medio fue equilibrado con gas O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95:5 v/v), llegando a un pH de 7.4. A la solución KH utilizada durante la perfusión contenía 10  $\mu$ M de ácido nipecótico para prevenir la recaptura del [<sup>3</sup>H]-GABA liberado (Aceves *et al.*, 1995). El medio utilizado para despolarizar las terminales se preparó con una concentración 15 mM de K<sup>+</sup>, además de los componentes utilizados para la elaboración del medio KH normal.

### Preparación de las rebanadas

Las ratas fueron decapitadas, los cerebros se removieron rápidamente y se colocaron sobre una placa metálica enfriada con hielo. Las rebanadas de cerebro se obtuvieron por medio de una microdisección de 300  $\mu$ m de ancho por rebanada, con ayuda de un vibrátomo. Las rebanadas se transfirieron a porta objetos fríos y se les realizó una disección, con la ayuda de un saca bocado, bajo la observación directa en un microscopio para obtener el globo pálido. Las rebanadas de globo pálido obtenidas en los 10 animales se agruparon y se

colocaron en un vial con solución Krebs-Henseleit (KH) a una temperatura de 37° C y con burbujeo constante con ) durante 30 minutos para su estabilización.

### **Liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA**

Tras el proceso de estabilización, las rebanadas fueron incubadas durante 30 minutos con 80 nM de [<sup>3</sup>H]-GABA en 2 ml de medio KH. El exceso de marca radiactiva fue removido mediante varios enjuagues con el medio KH adicionado con ácido nípecótico. Después las rebanadas fueron distribuidas aleatoriamente entre las 20 cámaras (volumen de 80 µl) del aparato de perfusión, de 4-5 rebanadas por cámara. Con ayuda de una bomba peristáltica de multicanal (Watson Marlow 205U), se realizó la perfusión paralela de las rebanadas en todas las cámaras. El medio KH utilizado para perfundir fue distribuido en vasos de precipitado, destinados a cada uno de los tratamientos (fármacos), colocados en un baño para mantener una temperatura constante de 38° C. Para asegurarnos de eliminar el GABA triteado que podría haber quedado atrapado fuera de la terminal, las rebanadas fueron perfundidas con KH durante 15 min antes de comenzar a coleccionar las fracciones para el conteo de radioactividad. Las fracciones de la perfusión fueron coleccionadas en un colector de fracciones cada 4 minutos. Primero se coleccionaron cuatro fracciones para determinar la liberación basal, después se cambió el medio KH para aumentar la concentración de K<sup>+</sup> de 3 mM a 15 mM durante el resto del experimento. Los fármacos para los respectivos tratamientos se agregan a este medio y fueron perfundidos durante 6 coleccionas más.

La liberación radiactiva de cada fracción perfundida fue medida mediante un contador de centelleo líquido (Beckman Coulter LS 6500). La radioactividad restante en el tejido al final del experimento fue evaluada después, extrayendo la radioactividad de las rebanadas con HCL 0.1 N.

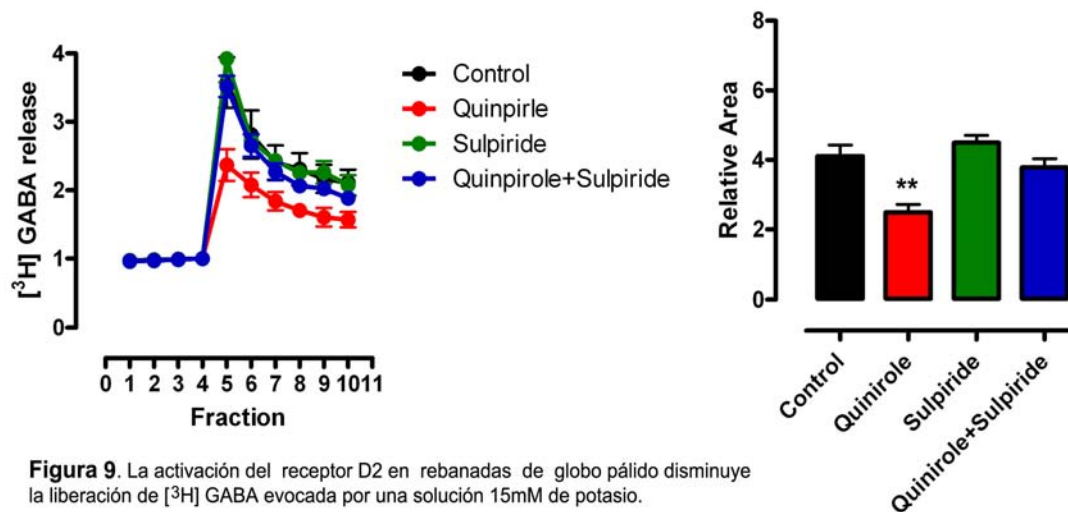
### **Análisis de datos**

En todos los experimentos se calculó, en primera instancia, la liberación fraccional por cada muestra, es decir, la radioactividad presente en la fracción dividida por el total de la radioactividad presente en el tejido al momento de coleccionar la fracción. La radioactividad total presente en el tejido al momento de hacer la colecciona se calculó añadiendo de nuevo la radioactividad obtenida entre el final del experimento y el momento del muestreo a la radioactividad remanente al final del experimento.

Se realizó un estudio estadístico ANOVA de un factor para probar la significancia del efecto del fármaco, mediante el programa Graph Prism. Cuando los experimentos generaron valores significativo (P< 0.5), se procedió a realizar una prueba post-hoc de Tukey.

## Resultados

En los experimentos de liberación de [ $^3\text{H}$ ]-GABA, en rebanadas del globo pálido de ratas reserpinizadas, se observó que al utilizar un agonista de los receptores a dopamina del tipo D2 (Quinpirol 10  $\mu\text{M}$ ) los niveles de GABA radiactivo disminuyen, en comparación con los del control, tras evocar la despolarización de las terminales sinápticas con una solución de alto potasio (15 mM). Por otro lado, cuando se antagoniza selectivamente al receptor D2 con sulpiride (10  $\mu\text{M}$ ) los niveles de [ $^3\text{H}$ ]-GABA no son alterados con respecto del control. Finalmente al utilizar tanto al agonista como al antagonista de los receptores D2 puede observarse que la actividad de dicho receptor es prevenida por el sulpiride (figura 9). En base a los resultados obtenidos podemos sugerir que la activación de los receptores D2 mediante la dopamina endógena, que fue eliminada con la reserpina y luego sustituida con el agonista Quinpirol, juega un papel importante en la inhibición de la liberación de GABA en las terminales estriado-palidales.



**Figura 9.** La activación del receptor D2 en rebanadas de globo pálido disminuye la liberación de [ $^3\text{H}$ ] GABA evocada por una solución 15mM de potasio.

El siguiente paso en la etapa experimental fue estudiar la actividad de los receptores a adenosina del tipo  $A_{2A}$  en globo pálido de ratas reserpinizadas, con el fin de determinar si la actividad de estos receptores participaba en el control de la liberación de GABA de las terminales. En esta serie de experimentos pudo observarse que al emplear tanto un agonista (CGS 21680 10  $\mu\text{M}$ ) como un antagonista (CSC 10  $\mu\text{M}$ ) los niveles de [ $^3\text{H}$ ]-GABA no eran modificados de forma importante, presentando cantidades de GABA radioactivo muy similares a las del control (figura 10).

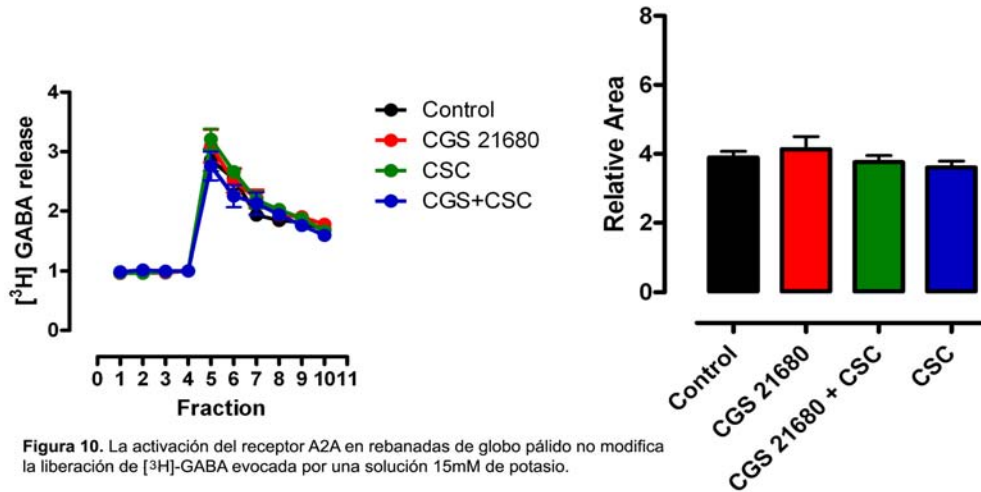


Figura 10. La activación del receptor  $A_{2A}$  en rebanadas de globo pálido no modifica la liberación de  $[^3\text{H}]$ -GABA evocada por una solución 15mM de potasio.

Debido a la relación que se ha sugerido entre los receptores  $A_{2A}$  y los receptores D2, en la siguiente serie experimental se coactivaron ambos receptores bajo las mismas condiciones que en los experimentos anteriores. En la figura 11, puede observarse que al activar únicamente a los receptores D2 estos producen una disminución en la liberación de GABA radiactivo de la misma forma que en la primera serie experimental; así mismo, al activar únicamente a los receptores  $A_{2A}$  los niveles de  $[^3\text{H}]$ -GABA se mantienen similares a los del control. Sin embargo, al coactivar ambos receptores se observa un aumento en los niveles de GABA marcado de casi un 50%, sugiriendo el restablecimiento de la actividad de los receptores  $A_{2A}$ , una vez que este actúa en conjunto con los receptores D2.

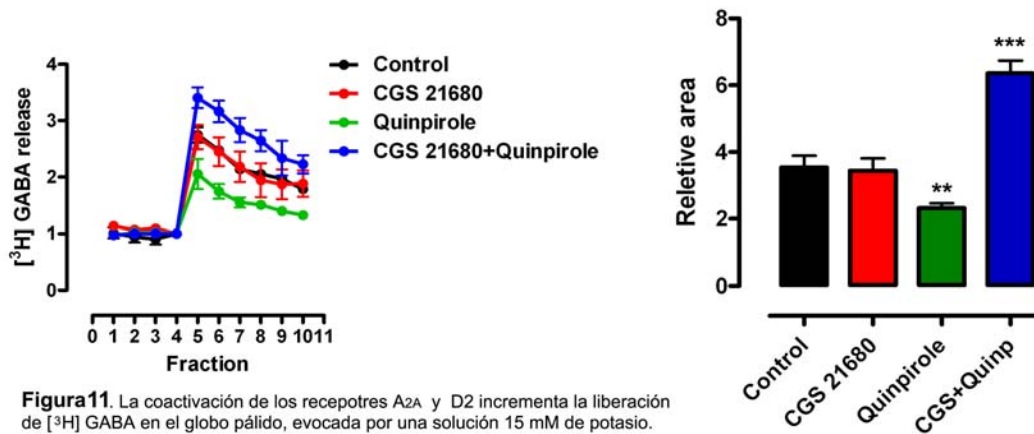
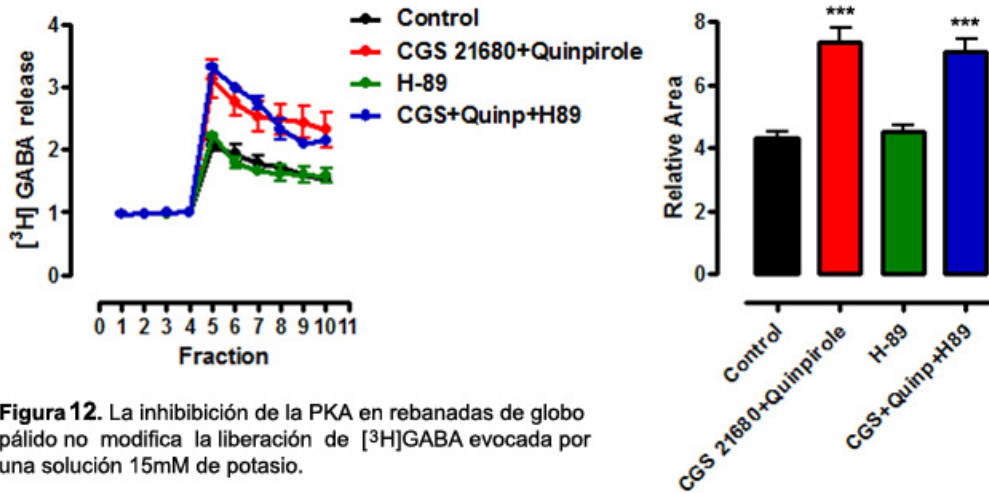


Figura 11. La coactivación de los receptores  $A_{2A}$  y D2 incrementa la liberación de  $[^3\text{H}]$  GABA en el globo pálido, evocada por una solución 15 mM de potasio.

Con el fin de determinar la vía de señalización implicada en el efecto potenciador sobre los niveles de liberación de GABA, que se generó al coactivar los receptores  $A_{2A}$  y D2, se realizó una serie experimental en la que, además de los agonistas respectivos para cada receptor, se utilizó H-89 (10  $\mu\text{M}$ ), un inhibidor de la PKA, bajo las mismas condiciones

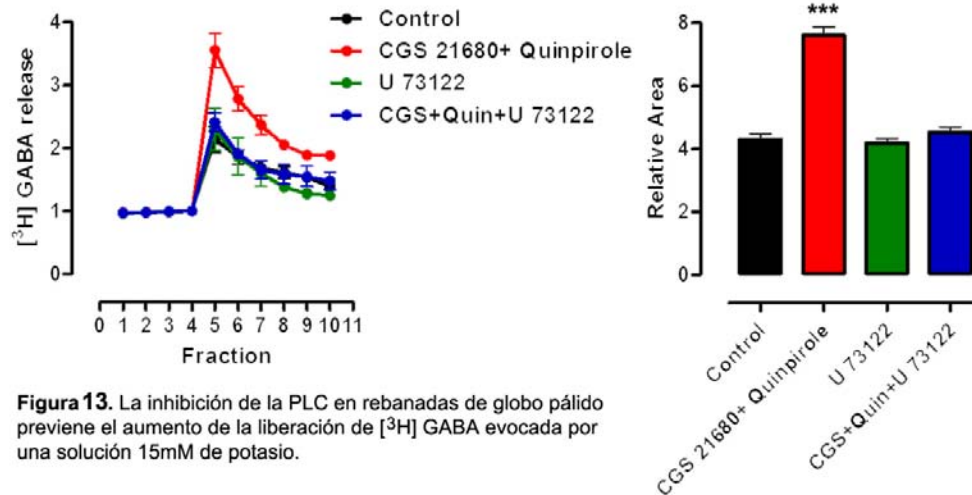
experimentales que en las series anteriores. En la figura 12 puede observarse el aumento en la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA, con respecto al control tras coactivar a los receptores A<sub>2A</sub> y D<sub>2</sub>; así mismo, se muestra que al coactivar ambos receptores mientras se inhibe la vía AC-PKA con H89 la cantidad de GABA radiactivo liberado no se modifica. Sugiriendo que el efecto tras la activación de ambos receptores no se lleva a cabo mediante la vía de señalización AC-PKA, vía característica de los receptores A<sub>2A</sub>.



**Figura 12.** La inhibición de la PKA en rebanadas de globo pálido no modifica la liberación de [<sup>3</sup>H]GABA evocada por una solución 15mM de potasio.

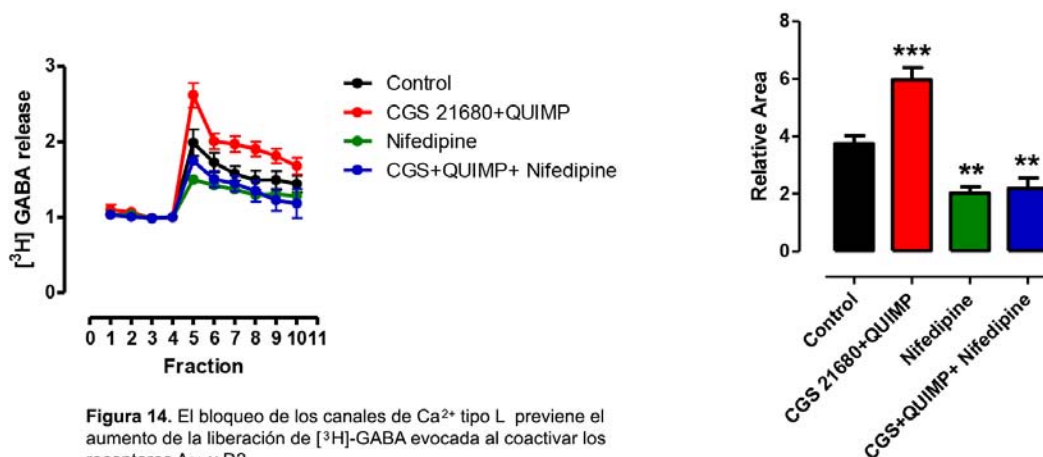
Una vez descartada la vía de señalización AC-PKA al comprobar que la inhibición de PKA no afecta la potenciación generada por la coactivación de los receptores A<sub>2A</sub> y D<sub>2</sub>, el siguiente blanco de la investigación fue la vía PLC-IP<sub>3</sub>/DAG que es una de las vías de señalización que se desencadenan tras la activación de los receptores D<sub>2</sub> en las terminales estriado palidales. Por tal motivo, la siguiente fase de la etapa experimental consistió en determinar si la vía PLC-IP<sub>3</sub>/DAG influía en el efecto sobre el incremento los niveles de GABA triteado al coactivar a los receptores A<sub>2A</sub> y D<sub>2</sub>.

Para esta serie experimental se utilizó el fármaco U 73122, un inhibidor de la PLC, además de los agonistas para los receptores A<sub>2A</sub> y D<sub>2</sub>, todos los tratamientos bajo las mismas condiciones que los experimentos anteriores. En la figura 13 se muestra nuevamente el incremento de los niveles de [<sup>3</sup>H]-GABA con respecto al control al coactivar los receptores A<sub>2A</sub> y D<sub>2</sub>; de manera muy interesante se observa que al inhibir la PLC mientras ambos receptores se encuentran activados, dicho aumento es prevenido y los niveles de GABA radiactivo permanecen en cantidades muy similares a las del control.



**Figura 13.** La inhibición de la PLC en rebanadas de globo pálido previene el aumento de la liberación de  $[^3\text{H}]$  GABA evocada por una solución 15mM de potasio.

Por último, con el objetivo de estudiar si los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, los cuales forman parte de la vía PLC- $\text{IP}_3$ /DAG, inflúan en la acción de la coactivación de los receptores  $\text{A}_{2\text{A}}$  y D2 sobre la liberación de neurotransmisor, se empleó nifedipino ( $10 \mu\text{M}$ ) un bloqueador de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, al mismo tiempo que se coactivaron los receptores  $\text{A}_{2\text{A}}$  y D2 utilizando a sus respectivos agonistas. La figura 14 muestra como se previene el aumento en la liberación de GABA radiactivo al coactivar ambos receptores al tiempo que se bloquean los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L. A partir de este resultado podríamos sugerir que la vía PLC- $\text{IP}_3$  que implica la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L está participando en el aumento de la liberación de GABA en las terminales estriado nigrales.



**Figura 14.** El bloqueo de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L previene el aumento de la liberación de  $[^3\text{H}]$ -GABA evocada al coactivar los receptores  $\text{A}_{2\text{A}}$  y D2.

## Discusión

Los resultados de la primera serie experimental mostraron una disminución considerable en los niveles de liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA al activar a los receptores D2 en ratas reserpinizadas, y también se observó la prevención de esta disminución al utilizar a un antagonista selectivo de dichos receptores bajo las mismas condiciones experimentales (figura 9). En base a lo reportado por Florán y colaboradores (1997) podemos sugerir que la dopamina endógena juega un papel fundamental en la inhibición de la liberación de GABA al activar los receptores D2 tónicamente.

Debido a que se ha demostrado la existencia de una interacción muy estrecha entre los receptores D2 y los receptores a adenosina del tipo A<sub>2A</sub> en terminales estriado-palidales de ratas con niveles normales de dopamina endógena (Ferré *et al.*, 2004; Florán *et al.*, 2005), se llevaron a cabo dos series de experimentos para estudiar esta interacción en ratas reserpinizadas. En la primera serie se estudió la actividad de los receptores A<sub>2A</sub>, los experimentos de liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA no mostraron diferencias significativas tras la activación o inhibición de estos receptores (figura 10) a diferencia del aumento en la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA que Recillas y colaboradores (2012) observaron al activar al receptor A<sub>2A</sub> en rebanadas de globo pálido obtenidas de ratas no reserpinizadas. En base a esta información podemos proponer que la dopamina endógena es indispensable en la activación de los receptores D2 de manera tónica y, por lo tanto, en la modulación de la liberación de GABA al interactuar con los receptores A<sub>2A</sub> debido a que estos receptores parecen permanecer “inactivos” en las terminales cuya dopamina endógena ha sido eliminada, a pesar del uso de agonistas específicos.

Una vez confirmada la participación de la dopamina endógena en la actividad de los receptores A<sub>2A</sub> y D2, la siguiente serie experimental tuvo como objetivo analizar el papel de la dopamina endógena al coactivar este par de receptores. En la gráfica de la figura 11, se observa claramente que al emplear agonistas específicos de ambos receptores se “restablece” la acción moduladora de los receptores A<sub>2A</sub> sobre los receptores D2 provocando un aumento en los niveles de GABA marcado. A partir de estos resultados podemos sugerir que en condiciones normales la dopamina endógena mantiene activados los receptores D2 de manera tónica y en consecuencia los receptores A<sub>2A</sub> se activan previniendo el efecto inhibitorio de los R-D2, dada la interacción antagónica que se ha hallado en trabajos anteriores (Azdad *et al.*, 2008) entre ambos receptores, lo que se traduce en un aumento en los niveles de GABA liberado.

Al demostrarse la importancia de la dopamina endógena en la acción conjunta de los receptores A<sub>2A</sub> y D2 surge la necesidad de responder a la pregunta: ¿qué vía de señalización es la responsable del aumento de liberación de GABA al coactivar ambos receptores? En

trabajos anteriores se señala claramente que los receptores D2 se unen preferentemente a proteínas G del tipo inhibitorio (Gerfen, 1992; Missale *et al.*, 1998, Neve *et al.*, 2004) mientras que los receptores A<sub>2A</sub> se caracterizan por acoplarse a proteínas G del tipo estimulador (Fredholm *et al.*, 2007). De acuerdo a la literatura, tanto el efecto estimulador como el inhibitorio son resultado de una modulación del funcionamiento de la adenilato ciclasa (AC), el primero aumentando su actividad y el segundo disminuyéndola. Dado que tanto los receptores A<sub>2A</sub> como los D2 han demostrado señalar por la vía AC-PKA de forma individual nuestro grupo de trabajo se dio a la tarea de determinar si esta vía de señalización era la responsable del aumento sobre los niveles de liberación de GABA al coactivar ambos receptores.

Después de realizar una serie de experimentos en los que se bloqueó la actividad de la PKA al mismo tiempo que se coactivaron los receptores A<sub>2A</sub> y D2 (figura 12) fue posible observar que, a pesar de haber bloqueado la vía de señalización, el aumento en los niveles de [<sup>3</sup>H]GABA no disminuyó con respecto a la condición en la que solamente se coactivaron los receptores, demostrándose que la señalización de ambos receptores se da por una vía alterna a la de AC-PKA. Asimismo, estos resultados nos advierten de un proceso de dimerización entre los receptores A<sub>2A</sub> y D2, señalado en literatura previa (Ferré *et al.*, 2004, Fuxe *et al.*, 2010), debido a que las vías de señalización que ambos receptores utilizan cuando son activados por separado, mismas en la que la AC se ve implicada, no están siendo utilizadas al coactivar ambos receptores lo que podría traducirse como un cambio de acople a proteínas G por al menos uno de los receptores que estarían formando al dímero.

Tras descartar la activación de la vía AC-PKA como medio de señalización del dímero A<sub>2A</sub>/D2, nuestra siguiente maniobra experimental fue enfocada a la vía de señalización PLC-IP<sub>3</sub>/DAG debido a los antecedentes que se tienen sobre la activación de esta vía por parte de los receptores D2 (Hernández-López *et al.*, 2000, Woods *et al.*, 2008). De los datos obtenidos al bloquear esta vía (figura 13) es importante resaltar que el aumento en la liberación de GABA radiactivo es prevenido al emplear U-73122, un inhibidor de la PLC, demostrando que la señalización por medio de esta vía es indispensable para la acción de los receptores A<sub>2A</sub> y D2 sobre la liberación de neurotransmisor al ser coactivados. Este cambio en la cascada de señalización naturalmente implica un cambio en el acople a proteínas G por parte de al menos uno de los receptores y por tanto refuerza la teoría de la presencia del heterómero A<sub>2A</sub>/D2 en las neuronas espinosas medianas que van del estriado al globo pálido dentro del circuito de los ganglios basales, pues recordemos que dentro de las características de estos complejos proteicos se habla de cambios en la unión a diferentes subtipos de proteínas G (Ferré *et al.*, 2007).

En 2003, Offermans señaló que las vías de señalización en las que la PLC se encuentra implicada están presentes tanto en las proteínas G<sub>i/o</sub> y las G<sub>q/11</sub>; así mismo, puntualiza que mediante la activación de las proteínas G<sub>i/o</sub> se tiene reportado el efecto sobre los canales de Ca<sup>2+</sup> de tipo P/Q y N. Por otro lado, en el año 2000, Hernández-López y colaboradores



realizaron un estudio muy completo en el que demostraron que los receptores D2 pueden señalar por medio de la activación de la vía PLC $\beta$ 1-IP3-Calcineurina provocando una disminución en las corrientes de Ca<sup>2+</sup> tipo L. Por otra parte, Fredholm et al., (2007) sugieren que los receptores A<sub>2A</sub> también podrían afectar dichos canales, permitiendo la entrada de este ión a la terminal, dada la acción estimuladora que estos receptores poseen.

Sabemos la importancia que poseen los canales de Ca<sup>2+</sup> para activar la maquinaria que permite a las terminales sinápticas liberar las vesículas que contienen el neurotransmisor y, en vista de que ambos receptores se han visto implicados en la actividad de los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo L, nos dimos a la tarea de determinar si la actividad del dímero A<sub>2A</sub>/D2, que señala por medio de la vía PLC-IP3/DAG, influye sobre dichos canales. Nuestros resultados mostraron que al bloquear estos canales el aumento en la liberación de neurotransmisor, inducida al coactivar a los receptores A<sub>2A</sub> y D2, es prevenida (figura 14). Estos datos revelan la importancia de los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo L en el proceso de señalización de ambos receptores al ser coactivados y, por lo tanto, una estrecha relación con el dímero A<sub>2A</sub>/D2.

Dada la información obtenida a lo largo de la etapa experimental de este proyecto, es posible descartar la vía AC-PKA como medio de señalización en la activación del dímero A<sub>2A</sub>/D2 debido a que los niveles de liberación de GABA radiactivo, al inhibir la vía antes mencionada, no presentan cambios con respecto al aumento generado en la coactivación de estos receptores. Estos resultados nos sugieren que el dímero A<sub>2A</sub>/D2 no está señalizando mediante el acople a una proteína G del tipo estimulador (G<sub>s</sub>), contrario a lo que se esperaba dada la señalización que ambos receptores muestran por separado; sin embargo, el bloqueo de la vía PLC-IP<sub>3</sub>/DAG sí previene el aumento en los niveles de liberación de neurotransmisor causado por el dímero en cuestión. Ambos resultados apoyan fuertemente la teoría sobre un cambio en la vía de señalización en la coactivación de los receptores estudiados. Asimismo, los datos obtenidos nos indican que el cambio de acople estaría dirigido, muy probablemente, hacia proteínas G cuya cascada de señalización implique la participación de la Fosfolipasa C, es decir, proteínas del tipo G<sub>i/o</sub> o G<sub>q/11</sub>.

Retomando lo mencionado por Offermans *et al.* (2003) con respecto a la señalización en proteínas del tipo G<sub>i</sub>, sabemos que parte de la cascada de señales de este tipo de proteínas, mediante la subunidad  $\alpha_i$ , implica la participación de la AC. Debido a que el bloqueo de la vía AC-PKA no presentó un efecto sobre el aumento de [<sup>3</sup>H]-GABA provocado al coactivar a los receptores A<sub>2A</sub>/D2, podríamos sugerir que la probabilidad de que este dímero se acople a una proteína del tipo inhibitorio es menor si se compara contra la posibilidad de un acople a proteínas del tipo G<sub>q/11</sub>. De hecho, el acople a proteínas del tipo G<sub>q/11</sub> se ha estudiado previamente en receptores D2 (Hernández-López *et al.*, 2000), en donde se ha encontrado que este tipo de acople influye sobre los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo L; así mismo,

Fredholm y colaboradores (2007) señalan la posibilidad de que los receptores  $A_{2A}$  también posean la capacidad de actuar sobre dichos canales.

Si la formación del dímero  $A_{2A}/D2$  ha sido sugerida con anterioridad (Rashid et al., 2007), al igual que la probabilidad de que ambos receptores tengan como efector final a los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L, y en base a la relación que nuestros resultados presentan entre estos canales y la actividad del dímero  $A_{2A}/D2$ , podemos sugerir que los receptores  $A_{2A}$  y D2, presentes en neuronas medianas espinosas de la vía estriado-palidal de los ganglios basales, presentan un proceso de dimerización en el que se genera un cambio de señalización que podría estar dirigido hacia un acople a proteínas del tipo  $G_{q/11}$ , activando la vía de PLC- $IP_3/DAG$  y en consecuencia modificando los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular a través de la modulación de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L. Sin embargo, es necesario profundizar el estudio sobre la señalización del dímero tanto por una  $G_{i/o}$  como por una proteína  $G_{q/11}$ , ya sea para descartar la participación de proteínas inhibitorias, o bien, para afirmar el cambio de acople hacia  $G_{q/11}$ .

## Conclusiones

A partir de los datos obtenidos durante la elaboración de este trabajo, se determinó que la vía de señalización utilizada tras la activación del dímero  $A_{2A}/D2$ , en globo pálido de rata reserpinizada, se da mediante la vía PLC-IP<sub>3</sub>/DAG. Por otra parte los experimentos realizados sobre la vía AC-PKA nos permitieron descartar la participación de esta vía en la coactivación del dímero.

En relación a los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L se determinó que estos mantienen una estrecha relación con el dímero  $A_{2A}/D2$ , siendo los efectores finales de la vía de señalización utilizada al coactivar ambos receptores.

Dada la existencia de una relación entre la actividad de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L para el funcionamiento del dímero  $A_{2A}/D2$ , así como la importancia de este dímero para el correcto funcionamiento del sistema de los ganglios basales, es un hecho que su estudio podría proporcionar información importante para generar una mejor comprensión sobre la enfermedad de Parkinson. De igual forma, experimentos enfocados al estudio de dichos canales podría suponer el desarrollo de una terapia alternativa al tratamiento de este padecimiento.

## Bibliografía

- Aceves, J., Floran, B., Sierra, A., and Mariscal, S. (1995). D-1 receptor mediated modulation of the release of  $\gamma$ -aminobutyric acid by endogenous dopamine in the basal ganglia of the rat. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* (19), 727- 739.
- Agnati, L F, Leo, G., Genedani, S, Andreoli, N., Marcellino, D, Woods, A, Piron, L., et al. (2008). Structural plasticity in G-protein coupled receptors as demonstrated by the allosteric actions of homocysteine and computer-assisted analysis of disordered domains. *Brain Research Reviews* (58), 459- 474.
- Azdad, K., Gall, D., Woods, A s., Ledent, C., Ferré., & Schiffmann (2008) Dopamine D2 and adenosine A2A receptors regulate NMDA- mediated excitation in accumbens neurons through A2A- D2 receptor heteromerization. *Neuropsychopharmacology*, 1-15.
- Bahena-Trujillo, R.; Flores, G., y Arias-montañol, J. A. (2000). Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Revista Biomédica* (11), 39-60.
- Barraco, R A., Martens, K A.,Parizon, M., and Normille, H J. (1994). Role of adenosine A<sub>2A</sub> receptors in the nucleus accumbens. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* (18), 545-553.
- Bear, M F., Connors, B W., and Paradiso, M A. (2007) Neuroscience exploring the brain. 2<sup>nd</sup> Ed. Lippincott Williams & Wilkins. Chapter 14, 465- 493.
- Betarbet, R., Sherer, T. B., and Greenamyre, J. T. (2002). Animal models of Parkinson ' s disease. *BioEssays* (24), 308-318.
- Björklund, A. and Hökfelt, T. (2005) Handbook of Chemical Neuroanatomy. First Edition. Vol. 21. Elsevier B. V. 573pp.
- Boison, D. (2008). Adenosine as a neuromodulator in neurological diseases. *Current Opinion in Pharmacology* (8), 2-7.
- Brailowsky, S. (2009) Las sustancias de los sueños: neuropsicofarmacología. 3ra edición. México: CFE, SEP, CONACyT.
- Dauer, W., and Przedborski, S. (2003). Parkinson ' s Disease : Mechanisms and Models, *Neuron* (39), 889-909.
- Dunwiddie, T. V., and Masino, S. A. (2001). The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annual Review of Neuroscience* (24),31-55.

- Ferraro, L., Beggiato, S., Cristina, M., Fuxe, K., Antonelli, T., and Tanganelli, S. (2012). A<sub>2A</sub> / D2 receptor heteromerization in a model of Parkinson ' s disease . Focus on striatal aminoacidergic signaling. *Brain Research* (1476), 96- 107.
- Ferré, S, Quiroz, C., Woods, A S, Cunha, R., Popoli, P., Ciruela, F, Lluís, C, *et al.* (2008). An Update on Adenosine A<sub>2A</sub> -Dopamine D<sub>2</sub> Receptor Interactions : Implications for the Function of G Protein-Coupled Receptors. *Current Pharmaceutical Design* (14), 1468-1474.
- Ferré, S., Ciruela, F. Canals, M., Marcellino, D., Burgueno, J., Casadó, V., Hillion, J., Torvinen, M., Fanelli, F. *et al.*, (2004) Adenosine A<sub>2A</sub>- dopamine D<sub>2</sub> receptor-receptor heteromers. Targets for neuro-psychiatric disorders. *Parkinsonism & Related Disorders* (10), 265- 271.
- Ferré, S., Ciruela, F., Woods, A S., Lluís, C., and Franco R. (2007) Functional relevance of neurotransmitter receptor heteromers in the central nervous system. *TRENDS in Neuroscience* 30 (9), 440- 446.
- Ferré, S., O'Connor, W T., Fuxe, K., and Ungerstedt, U. (1993) The striatopallidal neuron: A main locus for adenosine- dopamine interactions in the brain. *The journal of neuroscience* 13(12), 5402- 5406.
- Floran, B, Floran, L, Sierra, A, and Aceves, J. (1997). D2 receptor-mediated inhibition of GABA release by endogenous dopamine in the rat globus pallidus. *Neuroscience Letters* (237), 1- 4.
- Floran, B., Floran, L., Erlij, D., and Aceves, Jorge. (2004). Dopamine D4 receptors inhibit depolarization-induced [<sup>3</sup>H] GABA release in the rat subthalamic nucleus. *European journal of pharmacology* (498), 97 - 102.
- Floran, B., Gonzalez, B., Floran, L., Erlij, D., and Aceves, J. (2005). Interactions between adenosine A<sub>2A</sub> and dopamine D2 receptors in the control of [<sup>3</sup>H] GABA release in the globus pallidus of the rat. *European journal of pharmacology* (520), 43- 50.
- Fredholm, B B., Arslan, G., Halldner, L., Kull, B., Schulte, G., and Wasserman, W. (2000). Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* (362), 364-374.
- Fredholm, B. B., Chern, Y., Franco, R., and Sitkovsky, M. (2007). Aspects of the general biology of adenosine A<sub>2A</sub> signaling. *Progress in Neurobiology* (83), 263-276.
- Fresco, P., Diniz, C., and Gonçalves, J. (2004). Facilitation of noradrenaline release by activation of adenosine A<sub>2A</sub> receptors triggers both phospholipase C and adenylate cyclase pathways in rat tail artery. *Cardiovascular Research* (63), 739 - 746.

- Fuxe, K., Ferré, S., Genedani, S., Franco, R., and Agnati, L F. (2007). Adenosine receptor–dopamine receptor interactions in the basal ganglia and their relevance for brain function. *Physiology & Behavior* (92) 210 - 217.
- Fuxe, K., Marcellino, D., Borroto-Escuela, D O., Guescini, M., Fernández-Dueñas, V., Tanganelli, S., Rivera, A., Ciruela, F. and Agnati, L F. (2010). Adenosine – Dopamine Interactions in the Pathophysiology and Treatment of CNS Disorders. *CNS neuroscience & Therapeutics* (16), 18-42.
- Fuxe, K., Marcellino, D., Guidolin, D., Woods, A S., and Agnati, L. (2009). Brain Receptor Mosaics and Their Intramembrane Receptor-Receptor Interactions : Molecular Integration in Transmission and Novel Targets for Drug Development. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*, 2(1), 1-25.
- Gainetdinov, R R., Premont, R T., Bohn, L M., Lefkowitz, R. J., and Caron, M. G. (2004). Desensitization of G protein- coupled receptors and neuronal functions. *Annual review of neuroscience* (27), 107- 44.
- Gerfen, C R. (1992) The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia. *Annual review of neuroscience* (15), 285- 320.
- Gordwood, P. and Hamon, M.(2006) Psychopharmacogenetics. Chapter 12. Transduction Mechanism G proteins. Springer Science + Business Media. New York, USA.
- Gsandtner, I., and Freissmuth, M. (2006). A Tail of Two Signals : The C Terminus of the A<sub>2A</sub>-Adenosine Receptor Recruits Alternative Signaling Pathways. *Molecular Pharmacology* 70(2), 447-449.
- Guyton, C A., and Hall, E J. (2006) Tratado de fisiología médica. 11<sup>a</sup> Ed. McGraw- Hill Interamericana. Capítulo 9. 165-184.
- Hammond, C. (2001) Cellular and Molecular Neurobiology. 2nd Edition. Academic Press. London. Chapter 1.
- 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 Ca<sup>2+</sup> currents and excitability via a novel PLCβ1-IP<sub>3</sub>-calcineurin- signaling cascade. *The journal of neuroscience* 20(24), 8987- 8995.
- Hurley, M J., Mash, D C., and Jenner, P. (2000). Adenosine A<sub>2A</sub> receptor mRNA expression in Parkinson’s disease, *Neuroscience Letters* (291), 54-58.
- Kase, H., Mori, A., and Jenner, P. (2004). Adenosine A<sub>2A</sub>- receptor antagonists : beyond dopaminergic therapies for Parkinson ’ s disease. *Drug discovery today: Therapeutic Strategies* (1) 51- 57.

- Missale, C., Nash, S R., Robinson, S W., Jaber, M., and Caron, M G. (1998) Dopamine Receptors : From Structure to Function, *Physiological reviews* 78(1), 189-225.
- Neve, K A., Seamans, J K., and Trantham-Davidson, H. (2004). Dopamine Receptor Signaling. *Journal Of Receptors And Signal Transduction* 24(3), 165-205.
- Obeso, J A., Rodríguez-Oroz, M C., Rodríguez, M., Arbizu, J., and Giménez-Amaya, J M. (2002). The Basal Ganglia and Disorders of Movement : Pathophysiological Mechanisms. *News in Physiological Sciences* (17),51- 55.
- Obeso, J A., Rodríguez-Oroz, M C., Rodríguez, M., Lanciego, J L., Artieda, J., Gonzalo, N., and Olanow, C W. (2000) Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *TRENDS in Neuroscience* (23), 8- 19.
- Offermanns, S. (2003). G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* (83), 101-130.
- Premont, R T., and Gainetdinov, R R. (2007). Physiological Roles of G Protein– Coupled Receptor Kinases and Arrestins. *Annual Review of Physiology* (69), 511- 534.
- Rashid, A J., O'Dowd, B F., Verma, V., and George, S R. (2007). Neuronal Gq/11- coupled dopamine receptors : an uncharted role for dopamine. *Trends in Pharmacological Sciences* 28(11), 551-555.
- Recillas, S., Paz, F., Florán, B., Aceves, J., Erlij, D. (2012) A<sub>2A</sub>-D2 receptors coactivation stimulates depolarization-induced GABA release via the PLC-PKC signaling pathway in striatopallidal terminals in the rat. 42<sup>nd</sup> Annual meeting of the society for neuroscience. New Orleans, LA.
- Simon, M I., Strathmann, M P., and Gautam, N. (1991) Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* (252), 802- 808.
- Svenningsson, P., Le Moine, C., Fisone, G., and Fredholm, B B. (1999). Distribution, biochemistry and functions of striatal adenosine A<sub>2A</sub> receptors. *Progress in Neurobiology* (59), 255- 396.
- Torvinen, M., Kozell, L B., Neve, K A., Agnati, L F, and Fuxe, K. (2004). Biochemical Identification of the Dopamine D2 Receptor Domains Interacting With the Adenosine A<sub>2A</sub> Receptor. *Journal of Molecular Neuroscience* (24), 173-180.
- Watson, C.; Kirkcaldie, M. and Paxinos, G. (2010) The BRAIN An Introduction to Functional Neuroanatomy. Academic Press. USA. Chapter 1. Nerve cells and synapses.

Woods, A S., Marcellino, D., Jackson, S N., Franco, R., Ferré, S., Agnati, L F., and Fuxe, Kj. How calmoduline interacts with the adenosine A<sub>2A</sub> and the dopamine D2 receptors. *Journal of proteome research* 7(8), 3428-3434.

Zimmermann, H. (1993) Synaptic Trasmision: cellular and molecular basis. Oxford University Press. New York .