



30362

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

5

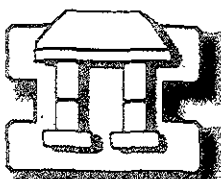
MAESTRÍA EN NEUROCIENCIAS

**Estudio del papel de los receptores para adenosina A_{2A} del
globo pálido, en la conducta motora mediada por
receptores D₂**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN NEUROCIENCIAS
P R E S E N T A:
GONZÁLEZ HERNÁNDEZ BRENDA**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. BENJAMÍN FLORÁN GARDUÑO
REVISORES: DR. DANIEL MARTÍNEZ FONG
DR. JUAN MANUEL MANCILLA DÍAZ**

**PROYECTO FINANCIADO
POR CONACyT 28085N**



LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉXICO 2001

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Esta tesis se desarrollo en le laboratorio #13 del departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) del IPN, con la dirección del Dr. Benjamín Florán Garduño, profesor asociado de este departamento y bajo la revisión del Dr. Juan Manuel Mancilla Díaz (UNAM), el Dr. Daniel Martínez Fong (UNAM-CINVESTAV), la Maestra en Ciencias Berta Segura (UNAM) y el Dr. Jorge Aceves Ruíz (CINVESTAV).

Este trabajo de tesis dió las siguientes comunicaciones a congreso:

1. *El agonista de los receptores A_{2A} CGS 21680 bloquea la acción inhibitoria de la dopamina endógena sobre la liberación de GABA en el globo pálido de la rata y produce giro ipsilateral en ratas tratadas con metanfetamina.* XLI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Zacatecas, Zacatecas. Septiembre, 1999.
2. *The A_{2A} agonist CGS 21680 in the globus pallidus blocks the inhibitory effect of endogenous dopamine on GABA release and induces ipsilateral turning behaviour in methamphetamine treated rats.* 29TH Annual Meeting, Society for Neuroscience, Miami Beach, Florida. Octubre, 1999.
3. *La activación de los receptores A_{2A} en el globo pálido de la rata produce giro ipsilateral en ratas tratadas con metanfetamina.* XX Congreso Latinoamericano de Ciencias Fisiológicas y XLII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Cancún, Q. Roo. Septiembre, 2000.
4. *A_{2A} receptors in the globus pallidus induce turning behaviour in methamphetamine treated naive rats.* 30TH Annual Meeting, Society for Neuroscience, New Orleans, Louisiana. Noviembre, 2000.

Y el siguiente artículo en proceso de publicación:

"A_{2A} receptors modulate D₂ receptor inhibited GABA release in the globus pallidus of the rat. A neurochemical and behavioural study"

A mis padres:

Gracias por todo el apoyo moral que me han dado y por la gran paciencia que ha tenido y que gracias a ustedes estoy a punto de terminar una fase más en mi formación profesional. Sin ustedes no sería posible.

A mis hermanas:

Por ayudarme a hacer menos pesada la estancia en esta ciudad y por estar ahí, para cuando las necesite.

A mi familia (en especial a mi tía Alicia):

Por recibirme en sus casas y por darme fortaleza en esta ciudad tan complicada.

A Gabriela:

Por escucharme y darme siempre un buen consejo.

A Víctor y José:

Gracias por enseñarme a moverme en esta ciudad y más que nada por su valiosa amistad y no dejarme vencer.

A Erick:

Gracias por simplemente estar ahí, cada vez que lo necesite. Gracias por tu amistad y t  carioo.

A Adriana:

Gracias por enseñarme y solventar todas mis dudas en el trabajo experimental.

A los del laboratorio #13 y #56:

Leo, Claudia y Luz, gracias por ser mis amigas y darme ánimos cada vez que los necesite. Al Sr. Arturo, por tener la paciencia para corregirme cada vez que lo requerí. A Vale, por ayudarme hacer el trabajo más sucio y uno de los más importante. Gracias a Ceci, por sacarme de muchos apuros, tanto secretariales como personales. Al Sr. Toño por las regañadas tan oportunas que me dio. Y a Nacho y Sandro gracias por su apoyo.

Al Dr. Benjamín Florán:

Gracias por el tiempo y conocimiento que me has dedicado así como el gran apoyo que me has dado.

RESUMEN	8
LISTA DE ABREVIATURAS	10
INTRODUCCIÓN	11
1. ANATOMIA FUNCIONAL DE LOS GANGLIOS BASALES	13
1.1 <i>Organización general</i>	12
1.2 <i>Interconexiones de los ganglios basales</i>	17
a. <i>Aferencias</i>	17
b. <i>Conexiones Internucleares</i>	17
c. <i>Eferencias</i>	18
1.3 <i>Circuitos básicos</i>	18
2. EL GLOBO PÁLIDO	21
2.1 <i>Estructura neuronal</i>	21
2.2 <i>Conexiones</i>	21
a. <i>Aferencias</i>	21
b. <i>Eferencias</i>	22
2.3 <i>Papel del globo pálido en la conducta motora</i>	23
3. DOPAMINA EN LOS GANGLIOS BASALES	25
3.1 <i>Neuroquímica y receptores</i>	25
3.2 <i>Papel de la dopamina</i>	31
3.3 <i>Dopamina en el globo pálido</i>	34
4. ADENOSINA EN LOS GANGLIOS BASALES	35
4.1 <i>Neuroquímica y receptores</i>	35
4.2 <i>Papel de la adenosina</i>	45
4.3 <i>Adenosina en el globo pálido</i>	47
5. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA	49
6. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	52
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	52
8. METODOLOGÍA	54
8.1 <i>Sujetos</i>	54
8.2 <i>Fabricación de cánulas de inyección intracerebral</i>	54
8.3 <i>Cirugía</i>	55
8.4 <i>Inyección intrapalidal</i>	56
8.5 <i>Cuantificación de la conducta de giro</i>	56
8.6 <i>Drogas</i>	57
8.7 <i>Verificación de la ubicación de cánulas</i>	57

9. RESULTADOS	59
9.1 <i>Activación de los receptores D2 palidales por la estimulación de metanfetamina</i>	59
9.2 <i>Efecto de la aplicación intrapalidal del agonista de los receptores A_{2a}, CGS 21680, sobre la respuesta a la metanfetamina</i>	60
9.3 <i>Efecto del bloqueo de los receptores A_{2a} palidales sobre la respuesta a la metanfetamina</i>	63
9.4 <i>Efecto del bloqueo de los receptores D2 y A_{2a} sobre el efecto del CGS 21680 intrapalidal</i>	65
9.5 <i>Verificación histológica de los sitios de inyección</i>	67
10. DISCUSIÓN	68
10.1 <i>En relación a la preparación</i>	68
10.3 <i>Papel de la adenosina en el globo pálido</i>	70
10.3 <i>Implicaciones en la enfermedad de Parkinson</i>	74
11. CONCLUSIONES	76
12. REFERENCIAS	77

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson tiene manifestaciones específicas relacionadas con el control motor, entre las que se encuentran: el temblor y la rigidez, hasta el momento se conoce que la causa de esta enfermedad es la falta de dopamina en los ganglios basales, en especial en el estriado. A últimas fechas se ha demostrado que este núcleo no es el único que recibe inervación dopaminérgica, -el globo pálido- que también es un núcleo de los ganglios basales recibe una inervación dopaminérgica que esta relacionada con el control motor.

Se ha iniciado la búsqueda de tratamientos más efectivo para la enfermedad de Parkinson, ya que el medicamento por excelencia es el uso del precursor de la dopamina, la L-DOPA, pero esta provoca efectos colaterales, como son las discenecias. Por lo cual se esta explorando un nuevo campo farmacológico basado en las posibles interacciones de la dopamina con otro neurotransmisor y/o neuromodulador, y al parecer el sistema adenosinérgico es una buena opción, ya que los receptores para adenosina se encuentran en las mismas neuronas que expresan los receptores de dopamina.

Así, el presente trabajo, se realizó para comprobar si esta interacción entre los sistemas de dopamina y adenosina, previamente demostrada en estudios "*in vitro*", muestran una correlación "*in vivo*" que se manifestaría a través de la conducta de giro.

La estrategia que se utilizó, para este fin, es el uso de microinyecciones a través de una cánula guía, implantada unilateralmente en el globo pálido de rata. El paso inicial fue determinar si un agonista adenosinérgico, produce conducta de

giro, obteniéndose resultados negativos, pero al co-administrar el agonista dopaminérgico, se produce un giro ipsilateral, y este fue revertido tanto con el antagonista de dopamina como con el de adenosina. Con estos resultados se evidencia una interacción dopamina/adenosina, en el animal integro, y que es necesaria la activación de ambos sistemas para que se evidencie una conducta motora.

Teniendo en cuenta esta interacción y que tiene una repercusión en la conducta motora, se puede hipotetizar que al actuar coactivamente los receptores de dopamina y adenosina, estos últimos pueden ser útiles para un tratamiento complementario para la enfermedad de Parkinson, ya que los antagonista de adenosina podrían disminuir o evitar algunos efectos colaterales del tratamiento con L-DOPA .

LISTA DE ABREVIATURAS

6- OHDA	6-hidroxidopamina
AMP	Monofostato de adenosina
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
ATP	Trifosfato de adenosina
AVT	Área Ventral Tgmental
BH4	Tetrahidroxilasa
DA	Dopamina
EP	Enfermedad de Parkinson
GABA	Ácido γ -amino butírico
GP	Globo pálido
GPe	Globo pálido externo
GPI	Globo pálido interno
HCM	Haz del Cerebro Medio
L-DOPA	L- dehidroxifenilalanina
MPTP	1-metil-4fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
mRNA	Ácido ribonucléico mensajero
NE	Núcleo entopeduncular
NST	Núcleo subtálmico
NT	Neurotransmisor
SN	Sustancia Negra
SNC	Sistema Nervioso Central
SNc	Sustancia Negra compacta
SNP	Sistema Nervioso Periférico
SNr	Sustancia Negra reticulata
TH	Tirosina hidroxilasa

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson continua siendo hoy en día un problema de salud mundial, así como un reto para la investigación básica y clínica. A pesar de la gran cantidad de investigaciones al respecto, las expectativas terapéuticas para la enfermedad se basan en tres líneas: las farmacológicas, las quirúrgicas y la terapia génica. Las dos últimas son altamente prometedoras pero se encuentran en desarrollo y aún no tienen el alcance esperado ni en todos los casos, ni a todos los pacientes. Debido a ello la farmacología es hoy en día el tratamiento de elección. Sin embargo, a pesar del éxito que representa la l-dopa como fármaco de elección inicial y con resultados terapéuticos sorprendentes, su uso se ve empañado por tres aspectos: el desarrollo de tolerancia, los efectos colaterales y por último la aparición de complicaciones derivadas de su uso como es la discinesia tardía.

Es por ello importante continuar con el desarrollo de nuevas alternativas, con el fin de solventar tal problemática. Una terapia farmacológica racional deberá basarse en el conocimiento de la fisiología de la dopamina y los ganglios basales que representan los ejes de la enfermedad, ya que la falta de dopamina es la que origina los síntomas y los ganglios basales son el sustrato anatómico en donde se localiza la lesión. La organización de los ganglios basales comienza a dilucidarse, y hoy se cuenta con esquemas de organización funcional que permiten entender cómo participan en el control motor y cómo se originarían los síntomas motores. Por otro lado, aunque la acción de la dopamina y su papel como neurotransmisor están en discusión, de manera general se puede suponer cómo es su participación en el control motor. Esto naturalmente abre nuevas expectativas terapéuticas para el

Parkinson. Otra línea de desarrollo e investigación, lo constituyen las probables interacciones entre la dopamina y otros sistemas de moduladores y/o neurotransmisores, con los que interactúa y pueden ser potencialmente útiles para el problema del Parkinsonismo. Tal es el caso de los fármacos con acción adenosinérgica, histaminérgica y cannabinoides que han sido propuestos. Es este sentido, es importante dilucidar cual es su interacción, como ocurre y de que manera modifican el control motor y más aún como participarían en la terapia para el Parkinson.

Por otro lado, la misma investigación ha dejado entrever, que contrario a lo que se pensaba, la acción de la dopamina, además de ser muy compleja como mencionamos, es muy extensa. Es decir originalmente se postula que la acción de la dopamina ocurre principalmente en uno de los ganglios basales: el estriado, sin embargo prácticamente todos los ganglios basales cuentan con innervación dopaminérgica cuya función es importante de entender. Lo que además, los coloca como sitios potenciales de acción terapéutica farmacológica. El presente trabajo representa un estudio en el cual se conjugan las dos líneas, por un lado la modulación de la acción dopaminérgica por receptores de adenosina y por el otro su acción en un núcleo extraestriatal con innervación dopaminérgica: el globo pálido. La idea es contribuir al entendimiento de la fisiología de los ganglios basales, la dopamina, la adenosina y a la fisiopatología y expectativas terapéuticas de la enfermedad de Parkinson.

1. ANATOMIA FUNCIONAL DE LOS GANGLIOS BASALES

1.1 Organización y función en general.

Desde finales de los 60's se ha investigado cual es el papel de los ganglios basales en la función motora y como participan en la fisiopatología de enfermedades como el Parkinson, la Corea de Huntington y otros tipos de trastornos motores (Garrett y Crutcher, 1990; Chesselet y Delfs, 1996). El avance en los estudios de las funciones de los ganglios basales ha tomado fuerza debido a la descripción de la fenomenología clínica en humanos, pues los pacientes con Parkinson muestran una considerable dificultad para iniciar el movimiento, resultante de una lesión de dichos núcleos y que impacta directamente en la forma de vida de los pacientes. De esta forma, se ha formulado la hipótesis de que los ganglios basales son responsables del "aprendizaje motor de ejecución automática", y estos se han calificado como el programador de secuencias individuales motoras dentro de una de serie movimientos (Albin, Young y Penney, 1989).

Los desórdenes de los ganglios basales se han asociado con un amplio espectro de fenómenos clínicos, que van desde movimientos incontrolados excesivos, hasta los que tienen la característica de restringir el movimiento, como se ve en la enfermedad de Parkinson (Albin, *et al*, 1989).

Estos desórdenes motores se clasifican de la manera siguiente:

- a) Hipocinéticos: Desórdenes caracterizados por la dificultad para iniciar el movimiento (acinesia), así como reducción de la amplitud y velocidad de éste (Brdicinesia). Estos desórdenes generalmente van acompañados de rigidez muscular y temblor distal fino. Entre éstos se ubica la enfermedad de Parkinson.

b) **Hipercinéticos:** Se caracterizan por un exceso de actividad motora en forma de movimientos involuntarios (discinecias) y un grado variable de hipotonía. En esta clasificación se encuentra la corea de Huntington y el hemibalismo (Mahlon, 1990).

Para entender el origen de estos síntomas, es necesario conocer la anatomía clásica de los ganglios basales, que de manera general, son un grupo de núcleos subcorticales que están interconectados a lo largo del telencéfalo, diencefalo, y cerebro medio, como se ve en la figura 1.

El **estriado** es la estructura aferente de información motora de los ganglios basales. En algunos mamíferos, el estriado es una sola estructura, pero en la gran mayoría éste consiste de dos porciones: el caudado medial y el putamen lateral, los cuales están divididos por las fibras de la cápsula interna.

Las estructuras eferentes de los ganglios basales son: el **globo pálido Interno (GPI)** y la **sustancia nigra pars reticulata (SNr)**. Estos núcleos están separados por las fibras del haz cerebral peduncular, y en la mayoría de los animales, ambos núcleos muestran citología neuronal similar. Al igual que el caudado y el putamen, el GPI y SNr pueden ser considerados parte de un solo sistema neuronal, separados por un tracto de sustancia blanca.

En muchos mamíferos, el homólogo del GPI es el núcleo entopeduncular (EP), el cual está incrustado en las fibras del tracto corticofugal. El GPI y la SNr reciben proyecciones directas desde el estriado, y en adición a estas, reciben proyecciones indirectas del estriado que hacen relevo al globo pálido externo (GPE). De esta última se da origen a una larga proyección al núcleo subtálamico (NST) y de ahí al GPI/SNr. El núcleo subtálamico proyecta también fibras de regreso al GPE el cual da origen a un circuito de retroalimentación negativa.

El estriado proyecta también a la sustancia nigra pars compacta (SNc), y recibe a su vez, fibras provenientes de la misma. El neurotransmisor clásico de las neuronas de proyección del estriado, el globo pálido y la SNr es el GABA (Parrent, 1986); el de las neuronas del NST es el glutamato; y el de las neuronas de la sustancia nigra compacta (SNc) es la dopamina (Albin, *et al.*, 1989).

Estos núcleos forman un sistema que recibe entradas sinápticas de prácticamente todas las áreas de la corteza, las procesa y retroalimenta, vía el tálamo, hacia áreas de la corteza involucradas en la planeación motora. Estos no hacen conexiones aferentes o eferentes directas con la médula espinal, su principal aferencia proviene de la corteza y sus eferencias van a la corteza prefrontal, motora y premotora. Las funciones motoras de los ganglios basales son por lo tanto mediadas por la corteza frontal (Kandel, Schwartz, Jessel, 1996).

El estriado recibe aferencias glutamatérgicas desde la corteza y áreas talámicas. La mayoría de las neuronas estriatales (más del 90%), son neuronas de tipo espinosas medianas, que utilizan como neurotransmisor al GABA; la otra

variedad más importante de neuronas (cerca del 5%) son interneuronas no espinosas colinérgicas y GABAérgicas. Existen dos subtipos de neuronas estriatales eferentes GABAérgicas: “la neurona estriadopalidal”, la cual contiene encefalina y que conecta el estriado con el complejo palidal (el globo pálido externo); y “las neuronas estriado nigrales” y “entopedunculares”, las cuales contienen sustancia P y dinorfina. Estas últimas están conectadas directamente con las estructuras de salida de los ganglios basales, que son GPi y la SNr. Algunas neuronas estriadonigrales inervan la SNc (y el área tegmental ventral), la cual a su vez es el origen de las neuronas dopaminérgicas que inervan al estriado (Ferré, Fuxe, Von Euler, Johanson y Fredholm, 1992).

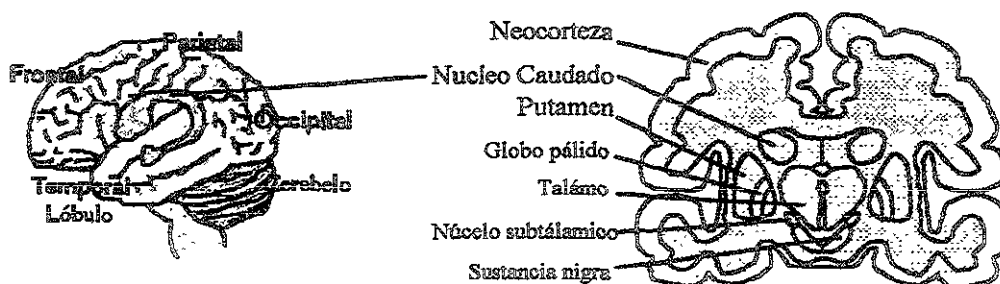


Fig 1. Diagrama esquemático de la ubicación de los ganglios basales dentro del cerebro: el estriado, el cual se compone por el núcleo caudado y el putamen; el pálido, el cual se compone por su segmento interno y externo; el núcleo subtálmico y la sustancia negra. (Tomado de Graybiel, 2000)

1.2. INTERCONEXIONES DE LOS GANGLIOS BASALES

a. aferencias de los ganglios basales

El neostriado recibe aferencias de dos orígenes distintos de los ganglios basales:

- La proyección corticoestriada: es la aferencia más importante, contiene fibras de toda la corteza cerebral: motora, sensorial, asociación y áreas límbicas.
- La proyección tálamo estriada está formada por aferencias de los núcleos intralaminares de tálamo, el origen de esta aferencia es el núcleo centromediano y termina en el putamen. Está organizado topográficamente, y representa una vía adicional por la cual la corteza motora puede influenciar a los ganglios basales.

b. Conexiones internucleares de los ganglios basales

Las conexiones entre los núcleos de los ganglios basales son:

- Vía estriadopalidal: la aferencia de las neuronas del neostriado que proyectan al globo pálido.
- Vía estriadonigral: eferencias estriatales que va a la sustancia negra.
- Vía pálido subtalamica. El núcleo subtálmico, recibe aferencias del segmento externo del globo pálido.
- Vía subtálamo nigral
- Vía Nigro-estriatal recibe una importante proyección dopaminérgica de la sustancia negra pars compacta.

c. Eferencias de los ganglios basales

La mayor vía de salida de los ganglios basales se origina en el segmento externo del globo pálido y la sustancia negra pars reticulata y proyectan a 3 núcleos del tálamo:

1. El ventral lateral.
2. El ventral anterior.
3. El núcleo mediodorsal.

El segmento interno del globo pálido tiene una proyección adicional al núcleo centromedial del tálamo. (Kandel, *et al*, 1996).

1.3. CIRCUITOS BÁSICOS

Teniendo en cuenta estas interconexiones en los ganglios basales se ha propuesto un circuito básico (corteza-núcleo de entrada-núcleo de salida-tálamo-corteza) conocido como circuito motor y dos vías (figura 2):

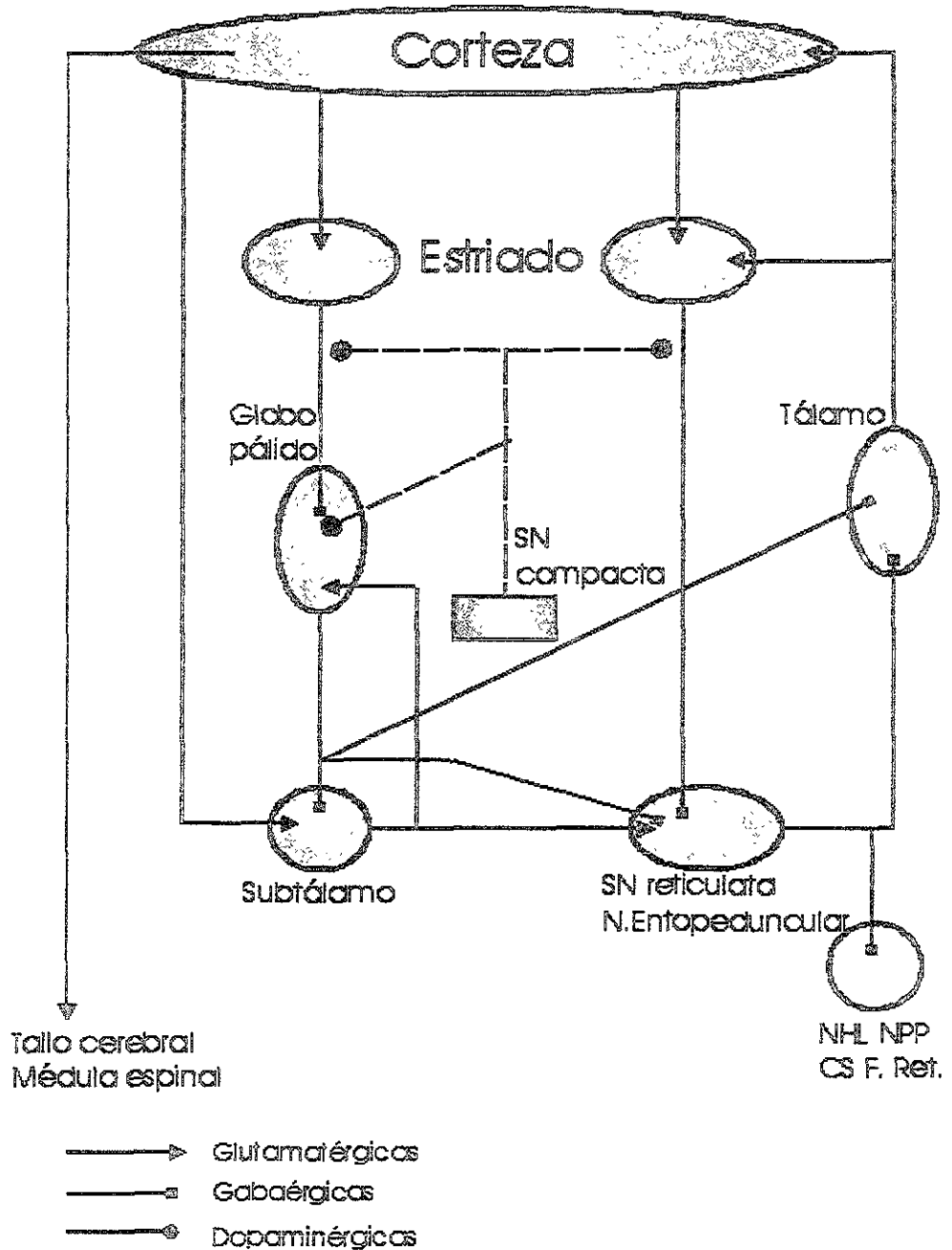
◆ VÍA DIRECTA, que conecta el estriado con los núcleos de salida de los ganglios basales (GPI y SNr), y que se origina desde las eferentes inhibitorias del estriado que usan GABA y sustancia P. La activación de esta vía tiende a desinhibir el tálamo el cual a su vez excita la corteza motora. Esta excitación trae como consecuencia la iniciación y facilitación del movimiento planeado.

◆ VIA INDIRECTA, de las neuronas de proyección del estriado que usan GABA y encefalina, al segmento externo del globo pálido, y de este núcleo al subtálamico, y finalmente a los núcleos de salida de los ganglios basales. La activación de la proyección inhibitoria GABA/encefalinérgica desde el estriado tiende a suprimir la actividad de las neuronas del GPe y por esto, desinhibir al núcleo subtálamico,

incrementando la conducción excitatoria sobre los núcleos de salida. La activación de la esta vía inhibe el tálamo lo que ocasiona en consecuencia la inhibición de la acción motora. La organización somatotópica paralela de ambas vías permite la focalización del movimiento a un grupo muscular específico por la activación-inactivación de su circuito motor fundamental.

Evidencias recientes sugieren que las proyecciones nigroestriatales que usan dopamina ejercen efectos contrastantes sobre las vías directa e indirecta. La aferencia dopaminérgica parece tener un efecto excitatorio sobre las neuronas estriatales de la vía directa, y efectos inhibitorios a las neuronas estriatales de la vía indirecta. La influencia de la dopamina dentro del estriado puede servir para reforzar alguna activación cortical iniciada sobre el circuito motor para la facilitar la conducción a través de la vía directa y suprime a la vez la conducción a través de la vía indirecta (Garrett, *et al.*, 1990).

A continuación mostramos un diagrama del circuito de los ganglios basales (figura 2) talámocortical y neurotransmisores. Donde se observan las dos vías directa e indirecta y la acción de la dopamina.



→ Fig 2. El circuito motor, ganglio basal-tálamo-cortical, comprende: 1) diversas áreas motoras precentrales (incluyendo el área motora suplementaria); 2) el putamen, el cual es parte del estriado o llamado también el área de entrada de los ganglios basales y recibe proyecciones desde las áreas motoras precentrales; 3) las porciones "motoras" del segmento interno del globo pálido y la sustancia nigra pars reticulata, donde ambas reciben proyecciones desde el putamen y son considerados los núcleos de salida de los ganglios basales; 4) porción del segmento externo del globo pálido y el núcleo subtálamico, y 5) parte del tálamo ventrolateral que recibe proyecciones desde las porciones motoras del globo pálido interno y la sustancia nigra pars reticulata y regresa a porciones específicas de las capas motoras precentrales. Las neuronas inhibitorias se representan las líneas negras, las neuronas excitatorias son las líneas blancas. Abreviaciones: DA, dopamina, enk, encefalina, GPe, globo pálido externo, Gpi, globo pálido interno, NPP, núcleo pedunculopontino, SNc, sustancia nigra compacta, SNr, sustancia nigra reticulata, subs P, sustancia P, NST, núcleo subtálamico.(Garrett, 1994 (Tomado de Mahlon, 1990).

2. GLOBO PÁLIDO ESTRUCTURA Y FUNCION

2.1. Estructura neuronal

El globo pálido de la rata es el homólogo al segmento lateral del pálido en primates y sus principales aferencias las recibe del estriado (Hauber, 1998). Este núcleo constituye la parte más pequeña y de situación más medial a lo que se conoce como el núcleo reticular. Una lámina medular medial divide el globo pálido en segmentos medial y lateral. Los haces de fibras mielínicas que lo atraviesan le confieren un aspecto más claro que el putamen y el núcleo caudado, en el cerebro fresco. Las células del globo pálido son predominantemente grandes neuronas fusiformes con largas dendritas lisas que se arborizan en formaciones con forma de disco paralelas a las láminas medulares. Todas las grandes neuronas de ambos segmentos del globo pálido son GABAérgicas y encefalinérgicas. Los axones de neuronas del globo pálido poseen escasas colaterales (Carpenter, 1991).

2.2. Conexiones palidales

a. Aferentes palidales

Las principales fibras aferentes hacia el globo pálido se originan en el neostriado y en núcleo subtálmico.

1. Fibras estriado palidales. Las macizas proyecciones estriadas se irradian en ambos segmentos del globo pálido. Se considera que tienen GABA como neurotransmisor y se distribuyen a ambos segmentos del globo pálido. Los estudios inmunocitoquímicos indican que las fibras estriadopalidales, también son inmunorreactivas para la encefalina.

2. Fibras subtalamopalidales. La mayoría de las fibras se originan en las células de los dos tercios laterales del núcleo subtalámico y se proyectan hacia láminas bien definidas en las regiones dorsales del segmento lateral del globo pálido su neurotransmisor es el Glutamato.

3. Fibras nigro-compacto palidales. Por los años setenta, se hizo la descripción de que el globo pálido externo en fetos humanos y de ratas, reciben colaterales de la vía nigro-estriatal (Nobin y Bjorklund, 1973; Lindvall y Björklund, 1979). Uno de los primeros estudios realizado para encontrar esta inervación, fue el que describió que los axones de tipo dopaminérgico nigro-estriatales, cruzan el globo pálido en ruta al estriado y a lo largo de su trayecto dan origen a colaterales en el pálido, estas se ramifican repetidamente, haciendo contactos con numerosas neuronas palidales (Lindvall, *et al.*, 1979). Por lo anterior se sugirió, que todas las neuronas del globo pálido reciben terminales de las colaterales nigro-estriatales.

b. Eferentes palidales

Cada segmento del globo pálido proyecta a fibras hacia diferentes núcleos del tronco del encéfalo. Las fibras eferentes del globo pálido se pueden dividir en cinco haces principales:

a. Asa lenticular: estas fibras se originan en las porciones laterales del segmento medial del globo pálido, forman un haz bien definido en su cara ventral, ingresando al campo H de Forel.

b. Fascículo lenticular. Se origina en las porciones internas del globo pálido, surgen del borde dorsomedial de éste atraviesa las partes ventrales de la cápsula interna y finalmente ingresan al fascículo tálamico.

c. Proyecciones palidotálámicas. Se proyectan hacia los núcleos tálámicos ventral anterior (VApc, pars principalis) y ventral lateral (VLo, pars oralis) y emiten colaterales al núcleo centromediano. El núcleo tálamico ventral lateral, la pars oralis (VLo), se proyecta hacia el área suplementaria motora en la cara medial del hemisferio y hacia el área premotora lateral.

d. Fibras palidotegmentarias. Estas fibras descienden desde el campo H de Forel y terminan en la porción compacta del núcleo pedunculoprotuberencial. Estudios realizados en el mono, indican que las células del segmento medial del globo pálido tienen axones que se bifurcan y proyectan la misma señal a los núcleos tálámicos y al núcleo pedunculoprotuberencial.

e. Proyecciones palidosubtalámicas. Las células del segmento lateral del globo pálido se proyectan principalmente hacia el núcleo subtálamico. Las partes rostrales del segmento lateral del globo pálido se proyectan hacia las partes medial y rostral del núcleo subtálamico. Técnicas sensibles de marcado anterógrado indican que las neuronas del segmento lateral del globo pálido que se proyectan hacia el núcleo subtálamico emiten colaterales que se arborizan en las partes laterales de la sustancia negra reticular (Carpenter, 1991).

2.3 Papel del globo pálido en la conducta motora

Diferente estudios apoyan la idea de la participación del globo pálido en la conducta motora. Por ejemplo, las inyecciones unilaterales de haloperidol dentro del globo pálido producen giro ipsilateral. La inyección intrapalidal de atropina induce un giro contralateral y potencia el giro ipsilateral de haloperidol o arecolina cuando es

inyectado en el núcleo opuesto. (Costall, Naylor y Olley, 1972a). Por otro lado, ratas a las cuales se les practicó una palidotomía bilateral exhiben hiperactividad, pero al aplicar haloperidol este tiene un efecto depresor (Costall, Naylor y Olley, 1972b).

Una microinfusión bilateral de un antagonista selectivo para el receptor D₁ como el SCH 23390 y un antagonista para D₂ como el sulpiride da por resultado acinesia (Hauber y Lutz, 1999). Estudios neuroquímicos dan evidencia que el receptor para dopamina D₂ controla la liberación de GABA desde las aferentes estriatopalidales y que el receptor D₁ controla la liberación de glutamato probablemente de las aferentes subtalámicas. El bloqueo de los receptores D₁ y D₂ palidales produce inhibición de la actividad motora (Hauber, 1998).

En ratas lesionadas bilateral con ácido quinilínico en el globo pálido produce una reducción de la actividad motora espontánea, así como una reducción en la conducta de husmeo. Bajas dosis de D-antetamina (un agonista no selectivo de DA), produce hiperlocomoción y altas dosis induce estereotipias relacionadas con el husmeo en ratas normales. Estas conductas se reducen en las ratas en las que se provoca la lesión. Una lesión con ácido quinilínico potencia y revierte la catalepsia inducida por la administración sistémica de un antagonista D₁ el SCH 23390 o un antagonista D₂ el raclopride (Hauber, Lutz y Mönkle, 1998). Estos datos sugieren que el globo pálido no es solo un sitio de relevo de información de los ganglios basales, si no que también está relacionado, con el desarrollo de la conducta motora, y el centro de origen de la catalepsia y otras conductas relacionadas con la transmisión dopaminérgica.

En resumen los modelos de la organización funcional de los ganglios basales el GP es considerado como un núcleo de relevo entre el estriado y los núcleos de salida de los ganglios basales (el núcleo entopeduncular y la SNr en la rata). Como se

mencionó, las proyecciones del GP a las estructuras de salida es a través del núcleo subtálmico y al núcleo reticular tálamico y usa como neurotransmisor GABA. Además el GP recibe una pequeña proyección dopaminérgica de colaterales de la vía nigroestriatal. Esto nos provee de una suficiente evidencia de que el GP tiene un papel relevante en el control motor de los ganglios basales (Hauber y Fuchs, 2000).

3. DOPAMINA EN LOS GANGLIOS BASALES

3.1. Neuroquímica y receptores

La dopamina es un neurotransmisor catecolaminérgico de importancia en el sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos ya que participa en la regulación de diversas funciones como la conducta motora, la emotividad y la afectividad; así como en la comunicación neuroendocrina.

El estudio de los sistemas y receptores dopaminérgicos del SNC ha generado gran interés, debido a que diversas alteraciones en la transmisión dopaminérgica han sido relacionadas, directa o indirectamente, con trastornos severos como la enfermedad de Parkinson, la esquizofrenia y la hiperprolactinemia, entre otros, así como la adicción a drogas (anfetaminas y cocaína por ejemplo).

Las catecolaminas son compuestos formados por un núcleo catecol (un anillo de benceno con dos hidroxilos) y una cadena de etilamina o alguno de sus derivados. Las catecolaminas dopamina, adrenalina y noradrelina actúan como mensajeros químicos en el Sistema Nervioso de los mamíferos. En el Sistema Nervioso Periférico (SNP), la dopamina es modulador de la función cardíaca y renal, del tono vascular y de la motilidad gastrointestinal.

En los años 70's se estudió la distribución de los receptores para dopamina y se planteó existencia de dos tipos de receptores dopaminérgicos, denominados D₁ y D₂, aunque no fue hasta 1988 cuando se clonó el primer receptor dopaminérgico, el subtipo, D₂. En los últimos años se han utilizado diferentes estrategias experimentales para el estudio *in situ* e *in vivo* de los sistemas dopaminérgicos, así como para estudiar las características farmacológicas para el neurotransmisor (Bahena-Trujillo, Flores y Arias-Montaño, 2000)

METABOLISMO

Síntesis

La DA depende para su síntesis del aporte exógeno de tirosina y del transporte de esta a través de la barrera hematoencefálica. Por lo tanto la tirosina es hidrolizada hacia 1-dihidroxi-fenilalanina (L-DOPA) por la Tirosina hidroxilasa que es convertida a DA por la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos. El paso límite de la síntesis se encuentra al nivel de tirosina hidroxilasa. Esta enzima puede ser regulada en 4 niveles:

- I. Competencia entre las catecolaminas, como inhibición por producto final, con la tetrahidrobiopterina (BH-4), cofactor de la tirosina hidroxilasa.
- II. Disponibilidad intracelular de BH-4 y, en particular, de su forma fosforilada.
- III. Autoreceptores presinápticos, cuya activación regula la síntesis y liberación de DA. Este nivel es relevante para la farmacología de los sistemas dopaminérgicos.

IV. A nivel estriatal, el aumento en la frecuencia de descarga neuronal incrementa la activación de TH.

Liberación

La liberación de DA parece efectuarse mediante la entrada de calcio a la terminal, iniciada por la llegada del impulso nervioso y por el patrón de dicha descarga. La activación de los autoreceptores disminuye la liberación por retroalimentación negativa.

Recaptura.

Se ha identificado un transportador para la DA que funciona bidireccionalmente y que depende del gradiente de concentración del neurotransmisor (NT). Este transportador juega un papel importante en la inactivación y reciclado de la DA y constituye un sitio importante de acción farmacológica.

Metabolismo.

Una vez liberada, la DA es inactivada ya sea después de su recaptura a la terminal o desde el espacio extrasináptico. En el primer caso, la inactivación es realizada por la monoamino oxidasa (MAO) hacia ácido dihidroxi-fenilacético (DOPAC), mientras que fuera de la sinapsis, la inactivación se realiza por la COMT y por otra MAO hacia el ácido homovanílico (HVA). El HVA es el principal metabolito de la DA a nivel cerebral, y se ha utilizado su determinación en el líquido cefalorraquídeo como índice de actividad dopaminérgica. (Brailowsky y García-Muñoz, citado en Otero-Siliceo, 1996)

Receptores

Los receptores para dopamina pertenecen a la superfamilia de receptores (con más de 100 miembros) acoplados a proteínas G. En esta familia de receptores, el reconocimiento del neurotransmisor y la molécula efectora (típicamente una enzima que produce un segundo mensajero difusible) son entidades diferentes, acopladas entre sí por una proteína con capacidad para unir nucleótidos de guanina (proteína G).

Familias y subtipos de receptores dopaminérgicos

Con base en sus características moleculares se han descrito 5 subtipos de receptores para dopamina, los cuales han sido agrupados en familias farmacológicas denominadas D₁ y D₂, a partir del efecto de agonistas y antagonistas selectivos. La clasificación actual tiene su origen en la propuesta por Keibian y Calne en 1979, y de manera característica los receptores de la familia D₁ estimulan a la enzima adenil ciclasa conduciendo a la producción de AMPc, en tanto que la activación de los receptores pertenecientes a la familia D₂ inhibe su formación.

Receptor D₁

Tanto en el ser humano como en la rata, los receptores D₁ son cadenas de 446 residuos de aminoácidos. Características estructurales de este subtipo son una región i3 corta y un extremo carboxilo largo de 113-117 aminoácidos que se acoplan a proteínas Gs.

Distribución: es el más abundante en el SNC. Niveles altos del receptor se encuentran en el tubérculo olfatorio, el neostriado, el núcleo accumbens, las islas

de Calleja, la amígdala, el núcleo subtálamico, la sustancia negra (reticulata y compacta) y el cerebelo (capa molecular). Niveles moderados han sido encontrados en la corteza cerebral (frontal entorrinal y el cíngulo), el tálamo y el globo pálido.

Características farmacológicas: los receptores D₁ muestran una afinidad relativamente baja por la dopamina. Los fármacos que activan de manera selectiva al receptor son el SKF-38393 y el SKF-81297, en tanto que el fármaco SCH-23390 es un antagonista selectivo con muy alta afinidad por el receptor.

Típicamente la activación de los receptores D₁ conduce a la activación de proteínas Gs con la consecuente producción del segundo mensajero AMPc por estimulación de una o varias isoformas de la enzima adenilil ciclasa, localizada en la membrana celular (Bahena-Trujillo, *et al.*, 2000).

Receptor D₂

El primer receptor dopaminérgico clonado fue el subtipo D₂ el cual posee 7 dominios transmembranales, de 20 a 25 residuos hidrofóbicos cada uno, y están acoplados a sistemas de transducción intracelulares mediante proteínas G. Los 7 dominios intramembranales están conectados de forma alterna por asas citoplasmáticas (i1, i2, i3) y extracelulares (e1, e2, e3) y la región amino terminal corresponde a un dominio extracelular glicosilado.

Conformada por 3 subtipos denominados D₂, D₃ y D₄, los que muestran como característica una región i3 muy larga de 101 a 166 aminoácidos, dependiendo del subtipo y de la especie. Las regiones i3 largas parecen ser típicas de los receptores que inhiben la adenilil ciclasa (y por lo tanto la formación de AMPc) mediante la

activación de proteínas G α i. Dicha región es también rica en residuos de serina y treonina, mismos que pueden ser fosforilados por diversas cinasas de proteínas, regulando así el acople a la proteína G correspondiente.

El receptor D₂ existe en 2 formas generadas por procesamiento alternativo ("splicing") del mRNA generado por un gen único. La forma corta (D_{2s}) está formado por 414 aminoácidos respectivamente. La diferencia en residuos aminoacídicos se observa sobre todo en la región i3, conformada por 29 aminoácidos más en las formas largas del receptor. Dado que la región i3 es crítica para el acople a proteínas G, es probable que la variación en longitud de dicha región resulte en diferencias tanto en los procesos de transducción de señales como en la regulación de la activación de proteínas G.

Distribución: el receptor D₂ ha sido detectado en alta densidad en el neocórtex (neuronas GABAérgicas estriadopalidales), el tubérculo olfatorio, la capa molecular de la formación hipocámpal, el núcleo accumbens, las islas de Calleja y el área tegmental ventral. Se encuentra también en moderadas cantidades en la sustancia negra reticulata y la compacta (donde es expresado por las neuronas dopaminérgicas como autoreceptores sematodendrítico), la corteza cerebral (regiones prefrontal, entorrinal y el cíngulo), el globo pálido, la amígdala, el tálamo y el hipotálamo así como el núcleo subtálamico. Cabe destacar que en general la distribución del mRNA de las dos formas (corta y larga) del receptor coincide con la distribución del mRNA total para ambas formas.

Características farmacológicas: el receptor D₂ muestra una baja afinidad por la dopamina. La bromocriptina es un agonista por el cual el receptor muestra una alta

afinidad. Existen evidencias que los receptores D₂ se encuentran acoplados a proteínas G del tipo G_{αi} o G_{αo}. Típicamente la activación del receptor conduce a la inhibición de la adenilil ciclasa y por lo tanto de la formación de AMPc. Los receptores D₂ pueden también modular corrientes iónicas, en particular las activadas por voltaje, inhibiendo canales de Ca²⁺ (efecto presumiblemente mediado por proteínas G_{αo}) o facilitando la apertura de canales de K⁺ mediante proteínas Gi3. Se ha reportado que en líneas celulares transfectadas con el receptor D₂ la estimulación del mismo provoca la formación de IP3 y movilización de calcio a partir de depósitos intracelulares así como de corrientes de Na⁺ (Bahena-Trujillo, *et al.*, 2000).

3.2. Papel de la dopamina

El papel de la dopamina en los ganglios basales ha sido evidenciado en animales a los cuales se les destruye experimentalmente la vía nigro-estriatal y son considerados como un modelo útil para la enfermedad de Parkinson (EP). El modelo más popular es el de producir una lesión esterotáxica unilateral a través de la inyección de una neurotóxina como la 6-hidroxidopamina (6-OHDA) dentro del haz del cerebro medio (HCM) o la sustancia negra de ratas. Con este modelo, se tiene una inmediata y completa destrucción de las neuronas DA de la SNc y del área ventral tegmental (AVT), dando como resultado una depleción total de la DA y alteración de la regulación de los receptores postsinápticos de DA en el estriado ipsilateral a la inyección. Los cambios unilaterales en la vía nigro-estriatal conduce a una asimetría funcional la cual es cuantificable usando la conducta de giro provocado por agonista de DA, ya sea directamente como la apomorfina (Przedborski, Levivier, Jiang, Ferreira, Jackson-

Lewis, Donalson y Togasaki, 1995), originando como resultado giro contralateral que es debido probablemente al desarrollo de una hipersensibilidad de los receptores de DA localizados en el lado denervado.(Schwarcz, Fuxe, Afrati, Hökfelt y Coyle, 1979), También se puede estimular indirectamente como la anfetamina, que resulta en giro ipsilateral. Este procedimiento, reproduce solo un modelo de la EP lo cual es útil para probar tratamientos sintomáticos, nuevos medicamentos y trasplantes. Sin embargo tiene una utilidad limitada para el estudio de terapias neuroprotectoras y neurotróficas para la EP (Przedborski, *et al.*, 1995).

Cuando las neuronas dopaminérgicas del sistema nigroestriatal son estimuladas o se lesionan, los animales muestran serios disturbios motores, que van desde mostrar giros hacia el lado lesionado cuando son tratadas con drogas que incrementan la actividad de la dopamina del sistema nigroestriatal. indicando la participación de la dopamina en la simetría postural, también se observan cambios como disminución de la actividad locomotora que se refieren como movimientos discinéticos, bradicinéticos e inclusive la catalepsia (Ungerstedt y Arbuthnott, 1970).

La activación separada de los D₁ y D₂ es menos clara en los experimentos conductuales y depende del estado de supersensibilidad de los receptores de DA. Después de una denervación o un tratamiento subcrónico de reserpina, los agonistas D₁ y D₂ inducen estimulación conductual similar la cual puede ser bloqueada solo con los antagonistas apropiados (Sosalla, Mnazino y Heikkila, 1988). Sin embargo para obtener una respuesta claramente dopaminérgica es necesaria la coestimulación de ambos subtipos de receptores.

En roedores se han descrito diferentes tipos de conductas que se han relacionado con la estimulación de un receptor D₁ o D₂. La estimulación de un receptor D₁ por

medio del SKF 38393 aumenta la conducta estereotipada inducida por el agonista D₂, el RU 24213. Controversialmente, un antagonista D₂ puede inhibir el acicalamiento inducido por el SKF 38393. Además, el bloqueo de un receptor D₁ o D₂ puede dar una nueva conducta a través de la activación de otra clase de receptores de dopamina. Por ejemplo, tratadas con sulpiride, antagonista D₂ puede dar como resultado la expresión de masticar en vacío, como también se ha observado en ratas tratadas con SKF 38393 (Löschmann, Smith, Lange, Jähning, Jenner y Marsden, 1992). El SCH 23390, un agonista selectivo D₁, así como el haloperidol, espiroperidol, pimozide o sulpiride, inhibe la conducta de giro inducida por amfetamina, produciendo catalepsia y bloqueando las estereotipias (Robertson y Robertson, 1986).

En ratas normales la administración de un agonista selectivo D₁ o D₂ estimula conductualmente a la rata como el acicalarse (efecto de D₁) o conducta exploratoria y locomoción (efecto de D₂). La administración de un agonista no selectivo D₁/D₂, como la apomorfina provoca conductas estereotipadas. En ratas normales existe una compleja interacción entre estos dos receptores de dopamina, por lo cual es necesario la estimulación de ambos receptores para ver una completa estimulación y efectos de la DA en ganglios basales (Morelli, Fenu, Cozzolino y Di Chiara, 1991).

Los antagonistas D₁ y D₂, inducen similar efectos conductuales en ratas normales que incluyen antiestereotípica y efecto cataléptico. En contraste, solo el agonista D₂ induce una marcada estimulación conductual. El SKF 38393 (agonista D₁) no es efectivo para inducir efectos estereotípicos, aunque provoca un síndrome distinto que incluye, en particular, una conducta de acicalarse en exceso y una ligera activación no estereotípica; lo cual no ha sido bien descrita. Aunque éste da un marcado aumento de la estereotipias orales, si se administra conjuntamente con el quinpirole (agonista

selectivo D₂). Ahora bien, cuando se pone el quinpirole solo produce patrones de hiperactividad, excepto actividad oral (Arnt, Hyttel y Perregaard, 1987).

3.3. *La dopamina en el globo pálido*

Tomando en cuenta estas características, diversos estudios inmunocitoquímicos, se ha confirmado que los receptores D₁ y D₂ tienen una distribución regional similar en ratas, monos y el cerebro humano, en donde el D₁ en el cerebro de rata esta más densamente identificado en el núcleo entopeduncular. En contraste el receptor D₂ esta más densamente expresado en el segmento externo del globo pálido. En el cerebro de mono y humano, el receptor D₁ esta presente en el segmento interno del globo pálido y el receptor D₂ tiene bajos niveles en el segmento externo del globo pálido (Levey, Hersch, Rye, Sunahara, Niznik, Kitt, Price, Maggio, Brann, y Ciliax, 1993).

En el globo pálido externo la inmunoreactividad para el receptor D₂ es muy baja. Sin embargo, por microscopía electrónica a una magnificación mayor es evidente que el neuropilo del globo pálido contiene una pequeña población de receptor D₂ y ocasionalmente las espinas dendríticas de las neuronas espinosas del globo pálido son inmunorreactivas al receptor D₂ (Yung, Bolam, Smith, Hersch, Ciliax, y Levey, 1995). Por medio de técnicas inmunorreactivas, se ha determinado que las neuronas estriado-palidales son básicamente reactivas a los receptores D₂ (Yung Smith, Levey, y Bolam, 1996). El mRNA para el receptor D₂ es expresado por neuronas que se originan en la vía indirecta y van hacia el globo pálido (al segmento interno y externo del globo pálido en primates), que a su vez también expresan

encefalina (Yung *et al.*, 1995). También con estudios de hibridación *in situ*, se demostró que la mayoría de las neuronas estriado-palidales contiene mRNA para el receptor D₂ (Gerfen, Engber, Mahan, Susel, Chase, Monsma Jr. y Sibley, 1990). Se sabe que esta expresión está asociada al transporte axonal y funcionalidad del receptor D₂ en las terminales estriado-palidales y que su activación inhibe la liberación de GABA.

ADENOSINA EN LOS GANGLIOS BASALES

4.1. Neuroquímica y receptores

Hace 70 años Drury y Szent-György (1929) reportaron que la adenosina puede afectar a la circulación, respiración y motilidad gastrointestinal en animales intactos. Hace 40 años empezaron a obtenerse ciertos datos sobre el papel de la adenosina en el cerebro particularmente se encontró que la estimulación eléctrica puede incrementar la acumulación de 3',5'monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) en rebanadas de cerebro (Citado en Svenningsson, Le Moine, Fisone, y Fredholm, 1999). La adenosina es un nucleosido, la cual está compuesta por un azúcar de ribosa unida a la base púrica de adenina. La mayoría de la adenosina celular se encuentra en forma de un nucleótido (nucleósido fosforilado), particularmente en forma de 5'-monofosfatado de adenosina (5'AMP) y en trifosfato de adenosina (ATP) (Felman, Meyer, Quenzaer, 1997).

METABOLISMO DE LA ADENOSINA

Síntesis y liberación.

La adenosina puede ser formada en una vía bioquímica que incluye de nuevo la síntesis a partir del nucleótido 5'-monofosfato de inosina. Aunque esta vía es de menor importancia en el cerebro. El origen más importante de la adenosina cerebral parece ser 5'-monofosfato de adenosina (AMP), (Figura 3a). La síntesis intracelular de adenosina es catalizada por una forma citoplásmica de 5'-nucleotidasa. Una forma alternativa, es que la adenosina puede formarse fuera de la membrana celular por medio de ecto-5'-nucleotidasa. Esta ectoenzima está unida a la membrana; la cual está orientada hacia el espacio extracelular. El AMP extracelular es derivado del ATP, el cual es colocalizado y co-liberado con diversos neurotransmisores clásicos (acetilcolina y noradrenalina) en el sistema nervioso periférico (SNP) y posiblemente en el cerebro. Después de la liberación, el ATP activa a receptores membranales especializados y estos rápidamente la desfosforilan a 5'-AMP por diversas ectonucleotidasas. Ahora bien, por diversas condiciones puede verse aumentado el ATP y lo cual incrementa la adenosina en el espacio extracelular.

Una segunda vía para el origen de la adenosina es el producto de las reacciones de transmetilación. La transmetilación es importante en numerosas vías bioquímicas, incluyendo el catabolismo de las catecolaminas y la histamina. El metil donador en esta reacción es el S-adenosilmetionina (SAM), el cual durante el proceso es convertido a S-adenosilhomocisteína. La relevancia de este hecho es que la adenosina puede ser liberada por la S-adenosilhomocisteína por medio de la

enzima S-adenosilhomocisteina hidrosilasa (figura 3b). Esta vía parece ser un origen potencial de la adenosina en el tejido cerebral.

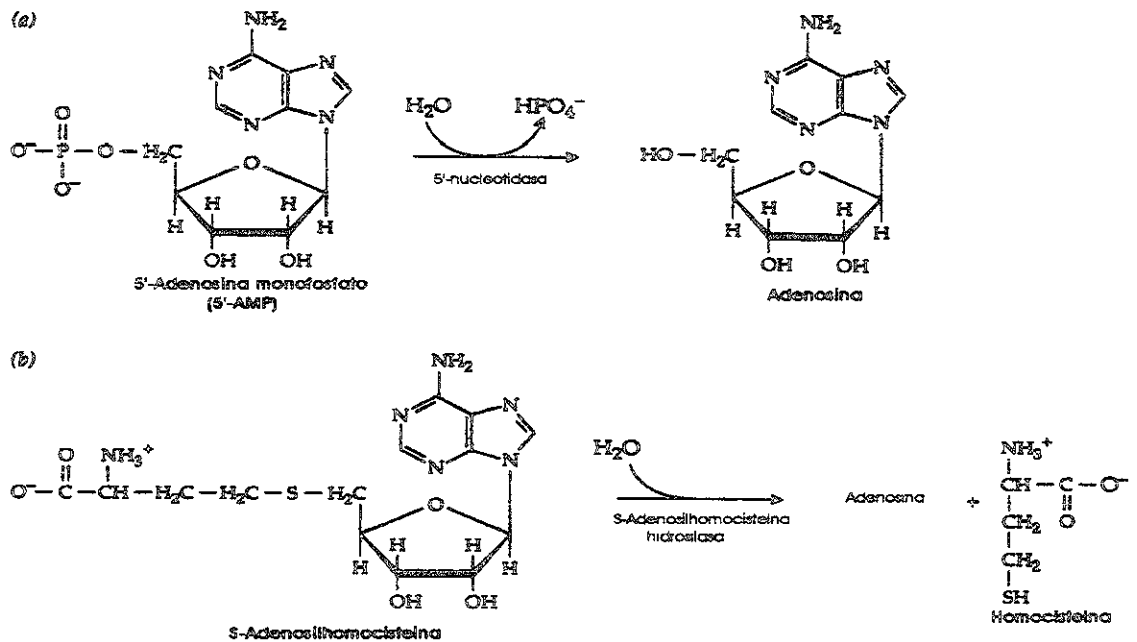


Figura 3. Biosíntesis de la adenosina (Tomado de Felman, *et al.*, 1997)

Inactivación de la adenosina.

El modelo de inactivación de la adenosina extracelular sugiere que se debe a la recaptura por medio de las terminales nerviosas y células gliales que la llevan fuera por un transportador membranar.

La adenosina cerebral intracelular es inactivada por medio de dos vías ilustradas en la figura 4:

a. Esta vía incluye la deaminación oxidativa de la inosina, la cual es catalizada por la enzima citoplasmática deaminasa adenosina. La inosina es

convertida a hipoxantina, la cual es oxidada a xantina y entonces el producto de deshecho es el ácido úrico (reacción que aún no es bien conocida)

b. Otra vía es la fosforilación por la enzima hipoxantina fosforibosiltransferasa (HPRT). Una reacción tardía es una vía alternativa que puede ser importante para el reciclaje de la adenosina por medio de la síntesis de nuevo 5'-AMP. Adicionalmente, la adenosina puede ser metabolizada a 5'-AMP directamente, por medio de la fosforilación de la kinasa adenosina. Formando de esta manera, 5'-AMP que puede ser después fosforilada a la forma de ATP (Felman, *et al.*, 1997).

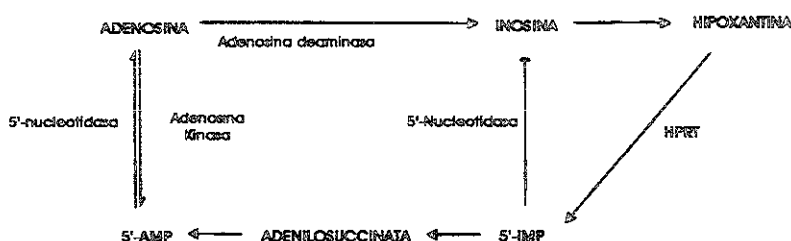


Figura 4. Vías de catabolismo de la adenosina (Tomado de Felman, *et al.*, 1997).

Receptores de adenosina.

La adenosina y sus receptores, tienen diversas funciones en la modulación de diferentes actividades del SNC. La adenosina ejerce sus diversas acciones fisiológicas a través de la activación de receptores específicos. Se han descrito cuatro receptores de adenosina (A₁, A_{2A}, A_{2b}, A₃), los cuales pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (Moreau y Huber, 1999).

Como cualquier otro receptor que esta acoplado a proteínas G, los receptores de adenosina operan a través de múltiples mecanismos de señales de

trasducción. El receptor A₂ (tanto el A_{2A} como el A_{2B}), se acopla positivamente a la adenil ciclasa, a través de una proteína G_s, el receptor A₁ al contrario se acopla negativamente a través de una proteína G_i. También se ha demostrado que los receptores A₁ estimulan la actividad de la guanilil ciclasa en el músculo liso, activan la apertura de los canales de K⁺ en el hipocampo y en el músculo cardiaco, inhibiendo la corriente de Ca²⁺ neuronal, y alterando la actividad del fosfatidil-inositol en varios tejidos. Se conoce muy poco acerca del mecanismo de acción del receptor A₃, pero en observaciones iniciales se sabe que inhibe la formación de adenil ciclasa y AMPc (Felman, *et al.*, 1997).

La diferenciación farmacológica de los receptores A₁ y A₂ está basada parcialmente en la potencia relativa de los agonistas como el: 5'-N-etilcarboxamida adenosina (NECA), N⁶-ciclohexiladenosina (CHA), N⁶-ciclopentiladenosina (CPA), 2-cloroadenosina (2-CA), R- N⁶-fenilisopropiladenosina (R-PIA) y el estereoisomero S- N⁶-fenilisopropiladenosina (S-PIA) para cada subtipo, siendo estos los más representativos para cada uno, sin dejar de tomar en cuenta que existen más agonistas afines para cada subtipo como el CGS 21680 (agonista selectivo para A_{2A}), el CCPA (agonista selectivo para A₁). (Felman *et al.*, 1997).

Receptor A₁.

El receptor A₁ con 326 aminoácidos y ha sido clonado en diversas especies (humano, rata, gallina, perro, bovino, y cerdo de guinea con un porcentaje de secuencias idénticas de un 90 a 95% (Moreau *et al.*, 1999). El orden de selectividad para los agonistas A₁ es: CPA>R-PIA=CHA>NECA>2-CHA>S-PIA y como

antagonista se ha usado el 1,3-dipropil-8-ciclopentilxantina (DPCPX), el cual ha mostrado que es altamente selectivo (Felman *et al.*, 1997).

Distribución: El receptor A₁ es un receptor que se encuentra en el estriado, estudios donde se realizó una lesión estriatal sugieren que estos se encuentran en las neuronas intrínsecas y en las aferentes corticoestriatales pero no en las aferentes dopaminérgicas. Los estudios funcionales indican la existencia de un receptor A₁ estriatal, el cual modula la liberación de DA. La expresión de mRNA fue recientemente demostrada en los dos subtipos de neuronas eferentes GABAérgicas y en las interneuronas colinérgicas estriatales. Los A₁ tienen una alta densidad de en los núcleos de salida, comparada con la poca expresión de mRNA encontrada en estos núcleos. Esto sugiere que el receptor A₁ esta localizado en las terminales nerviosas (Ferré, Fredholm, Morelli, Popoli y Fuxe, 1997).

Receptor A₂

Receptor A_{2A}

El receptor en humano consta de 412 aminoácidos. La homología del receptor de la rata, el ratón y el cerdo de guinea es de alrededor del 90%. Los análisis han mostrado por medio de la secuencia de proteínas que tiene 7 dominios hidrofóbicos lo cual es característico de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G.

En el humano el receptor A_{2A} es un gen localizado en el cromosoma 22q11.2 y contiene 2 exones interrumpidos por un solo intron de cerca de 7kb entre las regiones de los dominios transmembranales III y IV (Moreau, *et al.*, 1999).

Como otro receptor acoplado a proteínas G, el receptor de adenosina opera a través de múltiples señales de transducción (Feldman, *et al.*, 1997). Se ha demostrado que el receptor A_{2A} se acopla positivamente a la adenil ciclasa a través de una proteína Gs (Moreau, *et al.*, 1999), y para los ligandos de agonistas se requiere la presencia de Mg²⁺, esto en rebanadas estriatales de rata (Ribeiro, 1999).

Distribución: por medio de uso de northern blots e hibridación *in situ*, ha sido detectado el gen que codifica a los receptores A_{2A} en las neuronas estriatales. Durante la ontogenia, se ha encontrado una expresión transitoria del mRNA del receptor A_{2A} en la corteza cerebral, el núcleo parafascicular del tálamo, núcleo del facial, núcleo del trigémino, locus coeruleus, área postrema y glándula anterior pituitaria. Por medio de estudios autoradiográficos y de membranas con el radioligando agonista selectivo [³H]CGS 21680 se ha revelado altos niveles de sitios de unión sensitivos a GTP en el estriado (núcleo caudado, putamen, núcleo accumbens), tubérculo olfatorio y la capa externa del globo pálido en ratas y humano. Por medio de transcripción reversa PCR, se ha revelado que el mRNA para el receptor A_{2A} en corteza cerebral, amígdala, estriado, bulbo olfatorio, núcleo accumbens, hipocampo, hipotálamo, tálamo y cerebelo. Usando inmunohistoquímica con un anticuerpo monoclonal, este receptor se encuentra en el neuropilo del estriado, tubérculo olfatorio, septum lateral y núcleo del tracto solitario en el cerebro de rata. Altos niveles de inmureactividad se encontraron en las terminales nerviosas del GPe y pálido ventral, como se ve en la figura 5 (Svenningsson, Le Monie, Fisione y Fredholm, 1999).

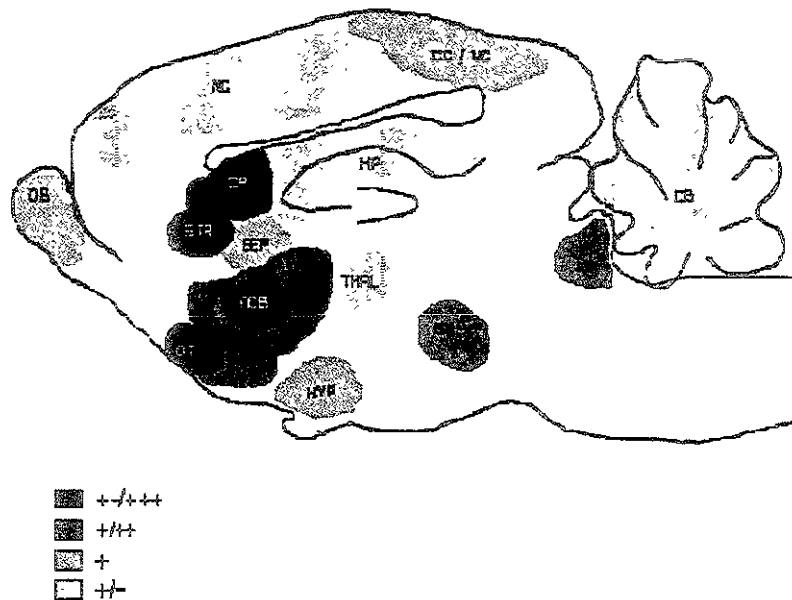


Fig. 5. Expresión y distribución de los receptores A_{2A} en el cerebro. Código: +++: alta densidad; ++: moderada densidad; +: baja densidad; -/: expresión no detectada. ACB: núcleo accumbens; AM: extensión de la amígdala; CC/VC: corteza visual y cíngulada; CB: cerebelo; CP: caudo-putamen; GP: globo pálido; HIP: hipocampo; HYP: hipotálamo; LC: locus coeruleus; NC: neocórtex; OB: bulbo olfatorio; OT: tubérculo olfatorio; SEP: septum; SN: sustancia nigra; SRT: estriado; THA: tálamo. (Tomado de Moreau, et al., 1999)

La distribución de los receptores A_{2A} es consistente con el rol propuesto de modular la neurotransmisión. Por ejemplo, la activación de los receptores A_{2A} en la corteza puede bloquear la isquemia inducida por la liberación de GABA. También en el tallo cerebral aunque hay bajos niveles del receptor A_{2A} , pueden estar incluidos en la regulación de la respuesta cardiovascular.

En las neuronas estratopalidales el receptor A_{2A} está colocalizado con los receptores D_2 (como se muestra en la figura 6). Se piensa que existe un antagonismo entre los receptores A_{2A}/D_2 y A_1/D_1 , en el estriado ventral y dorsal, y que esto es en parte responsable de los efectos motores estimulantes de los antagonistas para adenosina

como la cafeína y de acciones motoras inhibitorias de los agonistas de adenosina (Moreau, *et al.*, 1999).

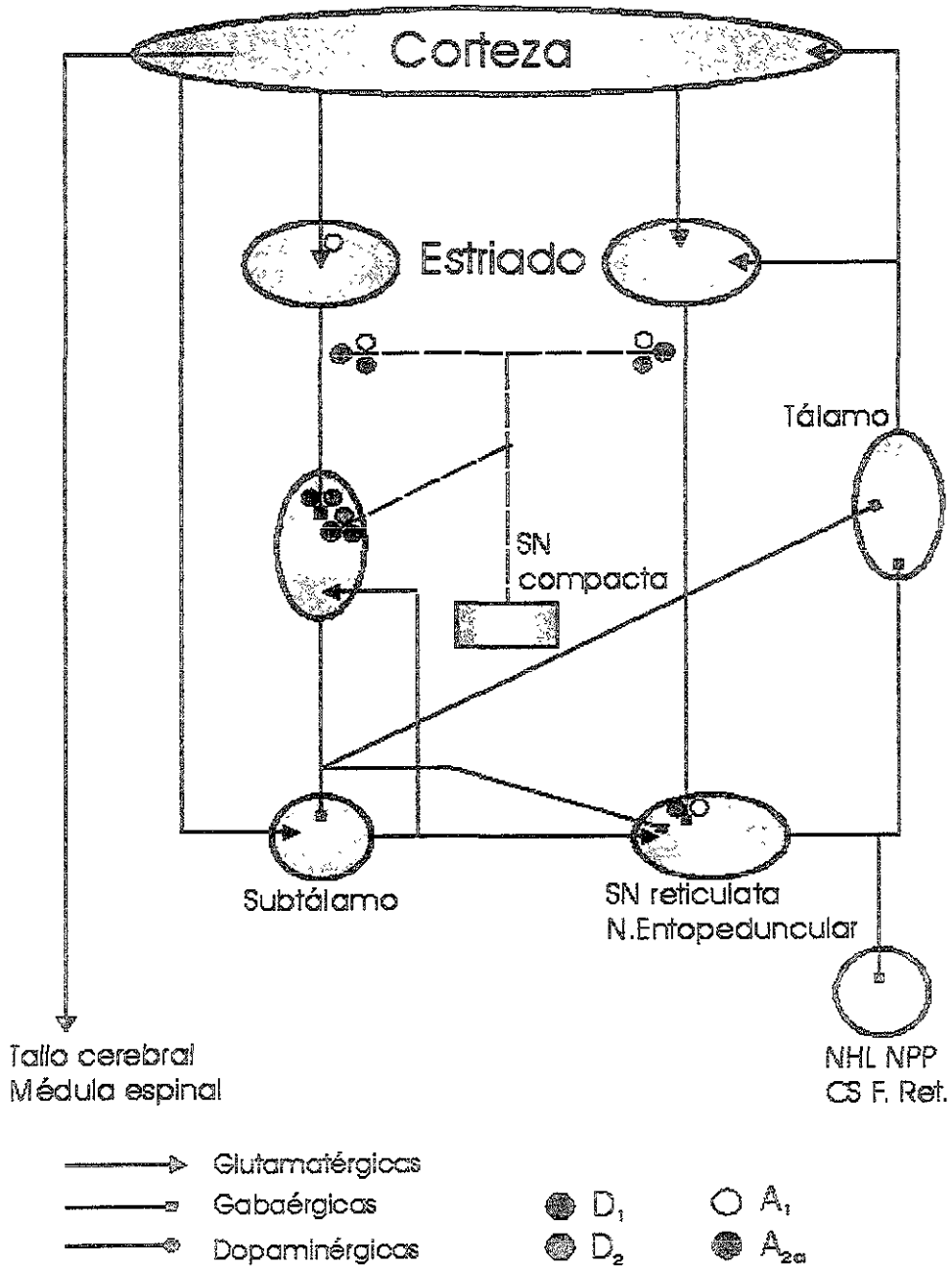


Figura 6. localización de los receptores D₁, D₂, A₁ y A_{2A} en los ganglios basales. Receptor A_{2A} y D₂, están localizados en las neuronas estriatopálidas GABAérgicas. GP, globus palidus; EPN, núcleo entopeduncular; STN, núcleo subtálmico; SNc, sustancia negra pars compacta; SNr, sustancia negra pars reticulata (Tomado de Ferré., *et al.*, 1997).

Receptor A_{2b}

El receptor A_{2b}, con 332 aminoácidos, ha sido clonado en el humano y en el ratón, con un grado de homología del 45% de secuencias idénticas (Moreau *et al.*, 1999), y el orden de selectividad para los agonistas A₂ tanto A_{2A} como A_{2b} es: NECA>2-CA>R-PIA=CHA=CPA>S-PIA y se ha utilizado el quinazolina y el CP667134, probando que pueden ser antagonistas relativamente selectivos (Felman *et al.*, 1997).

Distribución: El receptor A_{2b} tiene una distribución inespecífica en el cerebro y probablemente tenga un papel en condiciones patofisiológicas, ya que éste sólo se activa con altas concentraciones de adenosina (Ferré *et al.*, 1997).

El receptor A₃

Con 337 aminoácidos, ha sido clonado en humano, rata, perro, conejo y borrego. El receptor A₃ en humanos muestra de un 72 a 85% de identidad con la rata y el borrego. (Moreau *et al.*, 1999). En estudios de radioligandos, en donde se ha clonado el receptor A₃, exhibe aproximadamente una afinidad igual para R-PIA y NECA y así difiere de ambos subtipos de receptores A₁ y A₂ en la especificidad de los agonistas. En rata este receptor es relativamente escaso a la inhibición por los derivados de las xantinas, pero en humanos y en borregos este receptor es potencialmente bloqueado por cierta xantina como la 1-propil-3-(3-iodo-4-aminobenzil)-8-(4-oxizcetato)-fentilixantina (I-ABOPX) (Felman *et al.*, 1997).

Distribución: El receptor A₃: se encuentra en bajas concentraciones y ha sido localizado en el estriado y está implicado en la modulación de la actividad motora (Ferré *et al.*, 1997).

4.2. Papel de la adenosina

La cafeína (un antagonista no selectivo de adenosina), es ampliamente usada como droga psicoactiva ya que aumenta la vigilia en humanos. En roedores está incrementa la actividad locomotora y en general muestran una conducta similar a las de una droga psicoactiva (Casas, Prat, Robledo, Barbanoj, Kulisevsky y Jané, 1999).

En ratas jóvenes el antagonista selectivo para A_{2A}, el SCH 58261 y para A₁ el CPT estimulan la actividad locomotora (Popoli, Reggio, Pèzzola, Fuxe y Ferré, 1998). El CPA, agonista selectivo para A₁ y el APEC, para A_{2A}, reducen la actividad locomotora, el CPA induce depresión locomotora que es atenuada por el DPCPX, un antagonista selectivo A₁, pero no se logra con el antagonista selectivo para A_{2A}, el KF17387. Por el contrario, el APEC induce hipolocomoción que fue atenuada con el KF17387, pero no con DPCPX. Estos datos sugieren que los receptores de adenosina A₁ y A_{2A}, median la actividad locomotora por vías diferentes. Lo cual es compatible con su asociación a las vías estriado-nigral y estriado palidal respectivamente. La estimulación central del receptor A_{2A} con el APEC inhibe la locomoción inducida por anfetamina y atenúa la inducción del *c-fos* inducida por anfetamina, en el caudo-putamen y núcleo accumbens. El CGS 21680, otro agonista selectivo A_{2A}, provoca una reducción de la locomoción espontánea y catalepsia después de una microinfusión en el núcleo accumbens y caudo-putamen, respectivamente (Moreau, *et al.*, 1999), lo que sugiere mediación de efectos a través de la estimulación de receptores dopaminérgicos.

Microinfusiones bilaterales de MSK-2, un antagonista A_{2A}, produce una significativa estimulación motora y un aumento de la conducta de husmeo (Hauber,

Ángel, Sauer y Müller, 1998). La administración central de un agonista A_{2A}, induce catalepsia en la rata y este efecto puede ser contrarrestado por la administración sistémica de un antagonista de adenosina, la teofilina, o por un agonista D₂, el BTH-920 (Ferré, Rubio y Fuxe, 1991). Sugiriendo una vez más la participación de la dopamina en los efectos motores mediados por activación de los receptores de adenosina. Se piensa que como el receptor A_{2A} está co-localizado con los receptores D₂ de dopamina, adenosina y dopamina pueden interactuar funcionalmente uno con otro. La transmisión central de DA puede ser regulada por interacciones intramembranales A_{2A}/D₂, ya que la estimulación de un receptor A_{2A} en los ganglios basales decrementa la afinidad de los agonistas D₂. Consecuentemente, un agonista A_{2A}, como el CGS 21680, puede contrarrestar la actividad motora inducida por Anfetamina y las estereotipias inducidas por apomorfina (Moreau, *et al.*, 1999).

En general, los agonistas de adenosina producen un efecto similar al de los antagonistas de DA (Moreau, *et al.*, 1999). El CGS 21680, agonista selectivo A_{2A}, induce la expresión del gen *c-fos* en estriado denervado de DA. El cual es contrarrestado por un agonista D₂. Este resultado sugiere la existencia de un antagonismo en la interacción D₂-A_{2A} a nivel de la adenil ciclasa, por la inhibición tónica de los receptores D₂ hacia los A_{2A}, que es producida mediante la estimulación del AMPc, así como la expresión de genes tempranos. La administración de un agonista D₂ o un antagonista A_{2A} como la cafeína o un antagonista selectivo A_{2A} como el SCH 58261, induce el decremento en la expresión estriatal de algunos genes tempranos los cuales tienen una línea basal de expresión alta (Ferré, *et al.*, 1997).

Sin embargo a pesar de estos hallazgos la interacción dopamina-adenosina no esta aún adecuadamente dilucidada. No se ha mostrado la interacción a nivel de la adenil-ciclasa, ni si esta ocurre en el soma o terminales de las neuronas estriado-palidales a las que están asociados los receptores.

4.3 *La adenosina en el globo pálido*

Diferentes tipos de estudios apoyan la idea de un papel importante de la adenosina sobre la función palidal. Por medio de microdiálisis en vivo se demostró que la infusión del agonista A_{2A} como el CGS 21680 en el caudado-putamen contrarresta totalmente el efecto de un agonista D₂ ya que induce un decremento en los niveles extracelulares de GABA en el globo pálido ipsilateral. Bajas concentraciones de teofilina, un antagonista de adenosina, que por sí mismo no modifica los niveles extracelulares de DA en el estriado o de GABA en el GP, puede potenciar los efectos de un agonista D₂, mediando los niveles extracelulares de GABA palidal. La administración sistémica de antagonistas A₂ aumentan el efecto de la dosis submáxima de un agonista D₂ para prevenir el incremento en la expresión de *c-fos*. Esto ocurre en las neuronas estriadopalidales con un pretratamiento agudo de reserpina. El CGS 21680 contrarresta el incremento en la expresión del *c-fos* en el GP inducido por una administración sistémica de un agonistas D₂. Estudios *in vitro* en globo pálido de rata, han demostrado una interacción similar entre A_{2A}/D₂, a nivel de las terminales nerviosa de la neurona estriadopalidal, la cual contiene ambos receptores. En esta preparación experimental, la estimulación palidal de los receptores A_{2A} estimula y los D₂ inhiben la liberación de GABA. El receptor D₂ controla la inhibición palidal de la liberación de

GABA, la cual puede ser abolida en presencia del agonista A_{2A}, el CGS 21680. En estudios usando preparaciones de sinaptosomas estriatales y palidales, han reportado que tienen un efecto opuesto a la estimulación de A_{2A}, ya que en estas preparaciones el CGS 21680 inhibe la estimulación de KCL cuando es liberado el GABA (Ferré, *et al.*, 1997).

Por medio de hibridación *in situ*, se observó que un agonista D₂, el quinelorane, produjo un incremento del mRNA para el gen *c-fos* en el globo pálido. Cuando se usó el antagonista para A_{2A}, el SCH 58261, no produjo cambios en el mRNA para el *c-fos*. La administración conjunta de agonistas D₁ y D₂ o el agonista DA más el antagonista A_{2A}, causó una potenciación de la expresión del mRNA para el *c-fos*, en el globo pálido (Le Moine, Svenningsson, Fredholm y Bloch, 1997).

En ratas con lesión unilateral con 6-OHDA, a las cuales se les administró un antagonista selectivo para A_{2A}, el KW-6002, se observó un marcado y constante decremento de los niveles de GABA extracelular en el globo pálido, no observándose cambios en los niveles de GABA extracelular en el globo pálido del lado contrario. Microinyecciones de CGS 21680 (agonista A_{2A}), en el estriado del lado no lesionado incrementó las concentraciones de GABA en el globo pálido, la cual es abolida por el bloqueo de los canales de Na⁺ dependientes de voltaje, con tetrodotoxina, liberada localmente dentro del globo pálido. La infusión intrapalidal de CGS 21680 también incrementa los niveles de GABA en el globo pálido (Oghi, Koga, Kurokawa, Kase, Nakamura y Kuwana, 2000).

Experimentos con microdiálisis, profundiendo en la región somatodendrítica de la neurona estriatopalidal GABAérgica con el CGS 21680 se contraresta la habilidad del agonista D₂, pergolide, para reducir la liberación de GABA palidal en

ratas despiertas y en movimiento. La perfusión combinada con bajas dosis del antagonista A_{2A} teofilina y pergolide conduce a un considerable aumento para reducir los niveles extracelulares de la liberación de GABA. Administración de CGS 21680 reduce la habilidad del agonista D₂ para incrementar la expresión del gen *c-fos* en el globo pálido (Fuxe, Ferré, Zoli y Agnati, 1998).

En ratas lesionadas con 6-OHDA a las cuales se les administra un antagonista A_{2A}, el SCH 58261, se potencia la conducta de giro inducido por L-dopa e incrementa la expresión de *c-fos* en el estriado y en el globo pálido (Moreau, *et al.*, 1999).

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los efectos sobre la actividad locomotora que tienen los antagonistas de los receptores para adenosina como la cafeína y otros, han despertado interés por su uso potencial en enfermedades que cursan con hipocinesia o acinesia, como la enfermedad de Parkinson. Esto se ha visto reforzado por al menos tres tipos de hallazgos.

1. Los modelos fisiopatológicos de enfermedad de Parkinson sugieren que existe una sobreactividad de la vía indirecta sobre la directa por la falta de dopamina, lo que explica la acinesia.
2. Los receptores para dopamina D₂ están asociados a la vía indirecta

3. Los agonistas de los receptores D₂ estimulan la actividad locomotora al igual que los antagonistas A_{2A} y de hecho estos últimos potencian grandemente el efecto de los agonistas D₂.

El hallazgo de la co-localización selectiva de los receptores D₂-A_{2A} en las neuronas estriatales de proyección al globo pálido, hace pensar que ésta es la base de este postulado, en el cual existe un antagonismo entre ambos receptores. Sin embargo, el nivel de interacción entre la dopamina y la adenosina se ha sugerido que ocurre a nivel intramembranal y que es de tipo antagónico, no está adecuadamente mostrado. Por ejemplo los efectos sobre la actividad neuronal de los receptores A_{2A} sugieren que estos no modifican el disparo ni la actividad eléctrica de las neuronas estriatales aunque sí la liberación palidal de GABA. La consecuencia de la activación del receptor A_{2A} sobre la liberación de GABA a nivel del estriado no es clara todavía, y la interacción a nivel de AMPc no está ha sido descrita. Dada la complejidad de este núcleo se ha dificultado dilucidar estos hallazgos. Estudios recientes de nuestro laboratorio han estudiado este problema a nivel del globo pálido, en donde los receptores D₂ y A_{2A} presinápticos coexisten. Estudiando la liberación de GABA en este núcleo, hemos encontrado que el antagonismo D₂ A_{2A} aparente obedece a una modulación de la sensibilidad del receptor D₂ por la adenosina, es decir la activación del receptor A_{2A} cambia la IC₅₀ (afinidad aparente) para la dopamina, definiendo la magnitud de la respuesta funcional resultado de su activación. En resumen la inhibición de la liberación de GABA provocada por la activación de receptores D₂ es atenuada por la activación del A_{2A}. Esto ocurre sin

que la activación del receptor A_{2A} *per se* tenga efecto alguno sobre la liberación del neurotransmisor.

Este hallazgo es importante en función de las implicaciones que tiene, por un lado la adenosina es solo un modulador que *per se* no modifica el flujo de información de la vía indirecta, sino que requiere de la activación previa del sistema dopaminérgico. Por otro lado el uso de antagonistas de adenosina en problemas de hipocinesia y específicamente en la enfermedad de Parkinson, está sujeta a la co-administración de los antagonistas A_{2A}, en conjunto con agonistas de dopamina. Naturalmente estos postulados requieren de comprobación mayor.

Primeramente es importante observar si la interacción dopamina-adenosina ocurre de esta manera en el animal íntegro es decir, si estas observaciones *in vitro* ocurren *in vivo*. Es importante responder si la adenosina modula la respuesta a dopamina y por si misma no tiene efecto en el animal íntegro. Datos conductuales así lo sugieren. Por otro lado es importante conocer si esta interacción esta presente en el globo pálido como lo sugieren estas observaciones.

Este trabajo tiene por objeto iniciar una serie de estudios en el animal íntegro, que conduzcan al esclarecimiento de algunos de estos aspectos de la interacción dopamina-adenosina en el globo pálido.

6. HIPOTESIS DE TRABAJO

Los receptores A_{2A} que antagonizan la acción de la dopamina en el globo pálido de la rata requieren de la activación previa de los receptores D_2 .

OBJETIVO GENERAL

Determinar las consecuencias de la activación de los receptores A_{2A} palidales que modulan la liberación de GABA en la conducta motora de la rata estimulada por metanfetamina y mediada por los receptores D_2 .

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La modulación de la adenosina sobre la función dopaminérgica palidal requiere de un modelo, en el que se active el sistema de la dopamina y se incremente la actividad locomotora del sujeto en estudio. En nuestra estrategia lo haremos a través de la inyección sistémica de la metanfetamina, una droga ampliamente conocida que estimula indirectamente los receptores para la dopamina tanto D_1 como D_2 a través de la movilización de la dopamina de sus compartimentos endógenos, en este caso las terminales dopaminérgicas del globo pálido y todos los núcleos que tienen esta inervación. Un requisito es demostrar la activación de los receptores D_2 palidales. Para ello colocamos una cánula intrapalidal y administramos el antagonista de estos receptores que es el, l-sulpiride, de acuerdo a lo observado en experimentos *in vitro* esta maniobra inhibe la liberación de GABA de la neurona estriado palidal. Como la inyección fue unilateral se provocó un desbalance motor

provocando una asimetría en la activación de los receptores dopaminérgicos que se manifestó como conducta de giro.

Una vez validado el modelo procedimos al estudio del efecto de la activación de los receptores A_{2A} con un agonista selectivo aplicado directamente a través de la cánula, lo que esperamos es provocar otra vez el desbalance que lleve a la expresión de la conducta de giro. La especificidad farmacológica se realizó con el bloqueo previo de los receptores A_{2A} con el fármaco selectivo. También se estudió el efecto de antagonistas selectivos de los receptores A_{2A} para ver si existe, en estas condiciones, suficiente adenosina endógena que los mantenga en cierto nivel de actividad. Por último el bloqueo los receptores D₂ para ver si se logra prevenir el desbalance resultado de la activación del receptor A_{2A} palidal.

8. MÉTODO

8.1 Sujetos

En todos los experimentos se emplearon ratas macho de la cepa Wistar con un peso de entre 180 y 200 g. al momento de la cirugía. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura y ciclo natural de luz, y con acceso libre a líquido y alimento. Después de la cirugía los animales regresaron a su medio habitual hasta la realización de los experimentos.

8.2 Fabricación de las cánulas de inyección intracerebral

El ensamble para realizar las inyecciones intrapalidales consistió en una cánula de inyección, una cánula guía y un mandril. Todos los elementos de este ensamble fueron fabricados en el laboratorio a partir de agujas hipodérmicas, se cortaron a la longitud adecuada empleando un taladro y un disco dental.

Las cánulas guías se fabricaron con agujas calibre 22; la longitud de cada una fue de 14 mm. Una de estas cánulas se implantaron crónicamente en el animal, como se describe más adelante, y para ocluirla se empleó un mandril de 14 mm de largo, cortando de una aguja de calibre 30.

Las cánulas de inyección también se fabricaron a partir de agujas calibre 30, su longitud fue de 15 mm de tal modo que al entrar a la cánula guía sobresalía 1 mm para que la punta de la cánula de inyección llegara al centro del globo pálido. La cánula de inyección se acoplo a un catéter de polietileno (d.i. 0.28 mm; d.e. 0.61) y

éste a una jeringa Hamilton de 5 µl, con la que se realizaron las inyecciones intracerebrales.

8.3 Cirugía

Un día antes de la implantación a los animales se les aplicó una dosis de 400 U de penicilina benzatínica por vía intramuscular, con la finalidad de prevenir infecciones. Al día siguiente los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral (400 mgrs /kg. i.p.). Una vez bajo los efectos del anestésico, se fijaron a un aparato estereotáxico estelar *David Kopf* y mediante un corte longitudinal en la piel, de aproximadamente 2.5 cm, se expusieron los huesos craneales. Los huesos parietales fueron perforados utilizando un "moto-tool" con una "fresa" de 1.5 mm de diámetro con lo cual se realizó un orificio de aproximadamente 3.5 mm de diámetro sobre el área suprayacente al globo pálido izquierdo. Se utilizaron las siguientes coordenadas: -0.4 posterior a bregma, 3.0 lateral a la línea media y 4.7 de profundidad a partir de duramadre. Las referencias anteriores fueron obtenidas del atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (1998) y corregidas por ensayo y error mediante pruebas con azul de metileno a través de la cánula guía, hasta teñir el globo pálido. Así mismo se colocó un tornillo (4 x 1.5mm) que sirvió como punto de fijación para el cemento acrílico dental. Una cánula guía de acero inoxidable se introdujo en el cerebro hasta quedar a 1 mm arriba del globo pálido. Una vez colocada se fijó con cemento acrílico dental. Todos los animales permanecieron en sus cajas durante 5 días de recuperación posquirúrgica.

8.4 Inyección intrapalidal

Las inyecciones intrapalidales siempre se realizaron de 10 a 20 minutos después de la administración de anfetamina o algún otro fármaco (ver más adelante).

Para la realización de las inyecciones, los animales fueron gentilmente sujetados y el mandril de la cánula guía se removió para insertar la cánula de inyección. A continuación, al animal se colocó en el cilindro de observación, y se le inyectó 1 μ l de la solución a estudiar, a una velocidad de 0.5 μ l/min. Mientras se realizaba la inyección, se observó la conducta del animal, y al terminar de inyectar se dejó la cánula de inyección por 3 minutos más, al cabo de los cuales se retiró suavemente y se reinició el conteo de los giros.

Como máximo, cada animal recibió dos inyecciones intrapalidales en diferentes sesiones, separadas al menos 48 h, después de 5 días de recuperación postoperatoria, los animales fueron asignados aleatoriamente a cada grupo experimental.

8.5 Cuantificación de la conducta de giro

Se registró la conducta de giro para evaluar el efecto de la activación de los receptores por los fármacos dopaminérgicos y adenosinérgicos (agonistas y antagonistas). Inmediatamente después de la inyección, sistémica o local, fueron puestos en cilindros de acrílico transparente para contabilizar el número de giros. El número de giros de 360° por minuto fue registrado por observación directa con

intervalos de 3 minutos, hasta que la rata dejó de girar durante 3 registros consecutivos.

8.6 Drogas

Todas las soluciones se prepararon el mismo día que se emplearon. Se administró alguna de las siguientes soluciones:

- Agonista no selectivo D_1/D_2 : metanfetamina (Sigma), disuelto en agua destilada. Dosis empleada: 10 mg/kg (i.p.).
- Antagonista selectivo D_2 : S(-)(-)-Sulpiride (RBI), disuelto en etanol. Dosis empleada: 17 mg/kg (s.c.).
- Agonista selectivo A_{2A} : CGS 21680 (Sigma), disuelto en DMSO (1%) y solución salina al 0.9%. Dosis empleadas: 5, 10 y 20 μ g (intrapalidal).
- Antagonistas selectivos A_{2A} : ZM 241385 (Tocris), disuelto en PEG 400 (100%). Dosis empleada: 10 μ g (intrapalidal). Y CSC (RBI), disuelto en DMSO (100%). Dosis empleada: 0.5 mg/kg (i.p.).

8.7 Verificación de la ubicación de las cánulas

Al terminar los experimentos, el animal fue sacrificado con una sobredosis de hidrato de cloral y su cerebro prontamente removido. Empleando un vibrátomo se realizaron de inmediato corte coronales de 300 μ m para verificar la situación de la cánula. Las rebanadas fueron colocadas bajo una lupa estereotáctica acoplada a una cámara digitalizadora de imágenes. Las imágenes así obtenidas fueron digitalizadas por medio de una tarjeta analógica-digital. Empleando un programa de dibujo

(CorelDraw 8) las imágenes digitalizadas se superpusieron a los esquemas correspondientes del cerebro de la rata (Paxinos & Watson, 1998) usando como marcas los ventrículos cerebrales y el estriado. De esta manera se determinó si la punta de la cánula de inyección estaba localizada dentro del globo pálido. En caso contrario, los datos de ese animal en particular se eliminaron del estudio.

9. RESULTADOS

9.1 Activación de los receptores D_2 palidales por la dopamina liberada a través de la estimulación con metanfetamina

Dentro de nuestra estrategia experimental, lo primero que se estudió fue si la liberación de dopamina, inducida por metanfetamina, activa los receptores D_2 del globo pálido ya que deberíamos contar con una preparación *in vivo* en la que los receptores estuvieran activos. Para lo cual se administró sistémicamente metanfetamina (que provoca la salida de dopamina endógena y de esta manera activa los receptores D_1 y D_2) el bloqueo de los receptores D_2 por l-sulpiride administrado enseguida de la metanfetamina en el globo pálido de manera unilateral, indujo conducta de giro ipsilateral; la aparición de los giros fue aproximadamente a los 5 minutos después de la inyección del l-sulpiride. El número de giros fue en incremento, presentándose el máximo alrededor de los 20 minutos, después de los cuales se mantiene estable durante el registro y con solo una pequeña disminución al final de las dos horas (figura 7). Cabe mencionar que la administración de metanfetamina o sulpiride *per se* no provoca giro. De acuerdo con el modelo de organización funcional de los ganglios basales, la presencia de giro ipsilateral por el l-sulpiride indica un aumento de la transmisión GABAérgica en el globo pálido que conlleva a una disminución de la activación cortical del lado ipsilateral a la administración y, en consecuencia la aparición del giro.

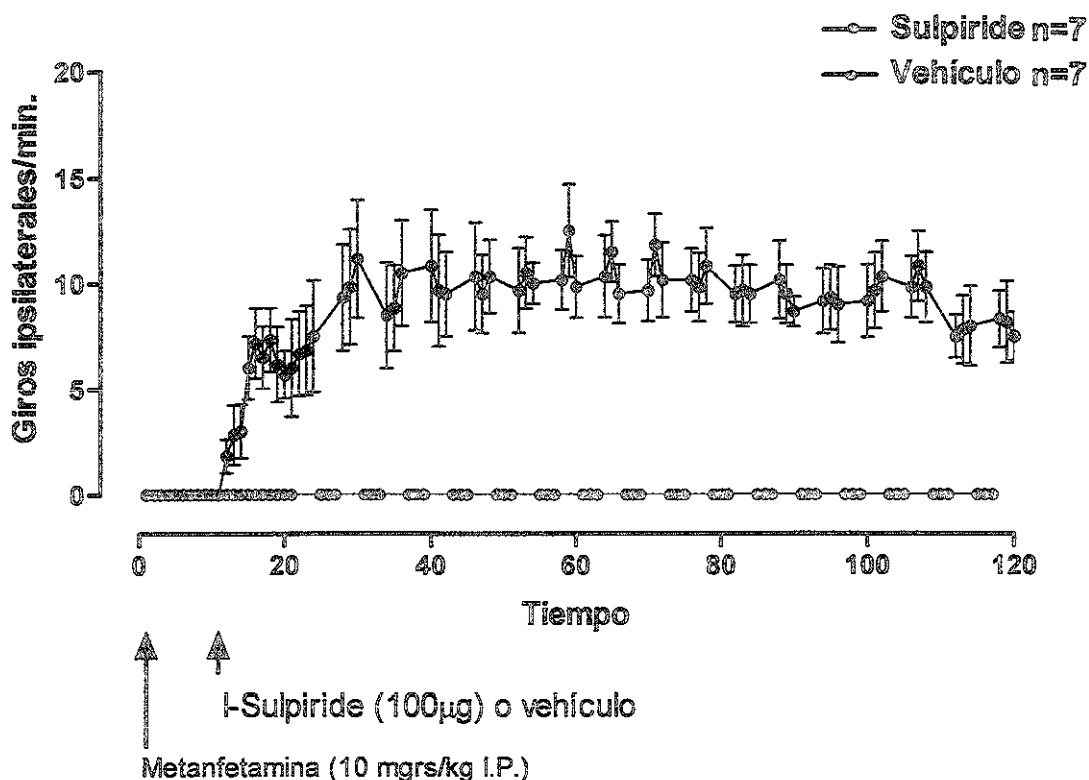


Fig. 7. El bloqueo la activación de los receptores D₂ por la dopamina liberada a través de la metanfetamina provoca giro ipsilateral. La gráfica muestra el efecto de la aplicación intrapalidal de 100 µg de l-sulpiride o su vehículo en ratas previamente tratadas con metanfetamina por vía sistémica a la dosis indicada en la figura. El registro se realizó durante dos horas y se muestra el promedio ± el error estándar de 7 animales.

9.2 Efecto de la aplicación intrapalidal del agonista de los receptores A_{2A}, CGS 21680 sobre la respuesta a la metanfetamina.

Habiendo confirmado la acción dopaminérgica a través de la activación de los receptores D₂ en el globo pálido por la maniobra de la administración de la metanfetamina, se procedió a estudiar el efecto de la activación selectiva de los receptores A_{2A} por medio de la administración de su agonista selectivo el CGS 21680 a tres diferentes dosis (5, 10 y 20 µg). Experimentos piloto mostraron que la administración intrapalidal del CGS 21680 de manera unilateral *per se* no induce asimetría motora ni conducta de giro. En la figura 8 se muestra que la

administración de 5 µgrs de CGS 21680 intrapalidal induce conducta de giro ipsilateral al sitio de la aplicación en ratas tratadas previamente con metanfetamina, indicando la necesidad de activación previa del sistema dopaminérgico para lograr su efecto. El giro se inicia casi inmediato a la aplicación y tiene un máximo a los 15 minutos con velocidad de 3-4 por minuto (figura 8). Por el contrario, la administración del vehículo no produjo efecto conductual (figura 8).

En un segundo grupo de experimentos se realizó la maniobra inversa, es decir primero se administró el CGS 21680 intrapalidal y luego la metanfetamina, con el objeto de ver si el CGS 21680 tiene un efecto *per se* y segundo mostrar la importancia de la activación de receptores dopaminérgicos en su efecto. Como se observa en la figura 9, el CGS 21680 indujo giro sólo hasta que se administró la metanfetamina de manera sistémica, y por otro lado no hay ningún efecto conductual si se administra la metanfetamina con la solución salina intracanalicular (figura 9).

En la figura 10 se muestra el efecto del CGS 21680 intrapalidal a diferentes dosis. Donde se muestra que el efecto del CGS 21680 es dependiente de la dosis. En el inserto se muestra la velocidad de giro máxima que se obtiene a los 30 minutos de administrada la droga.

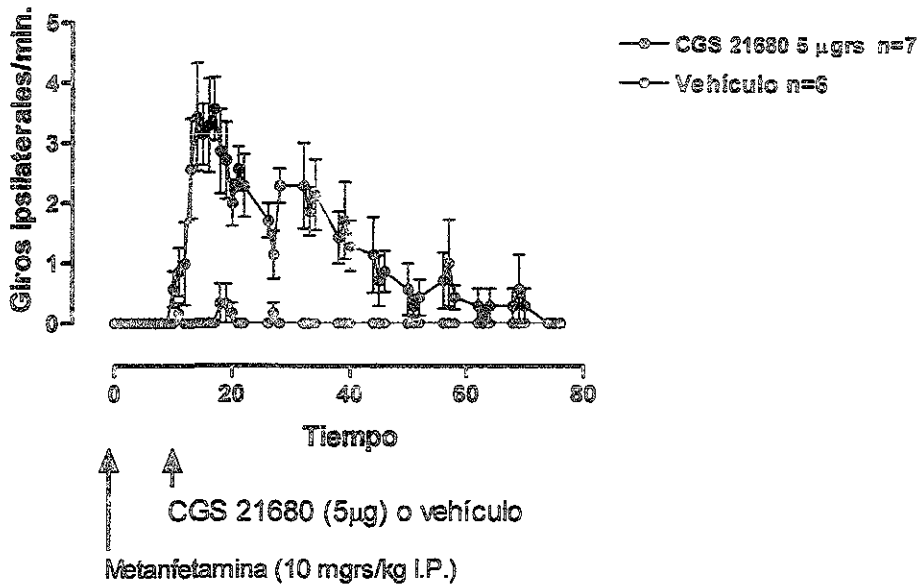


Fig.8 La activación de receptores A_{2A} palidales, produce conducta de giro en ratas tratadas con metanfetamina. La gráfica muestra el efecto de la aplicación intrapalidal de 5 µgrs de CGS 21680 o su vehículo en ratas previamente tratadas con metanfetamina por vía sistémica. El registro en este caso se realizó por 80 minutos y se muestra el resultado del número de animales ± el error estándar indicados en la gráfica.

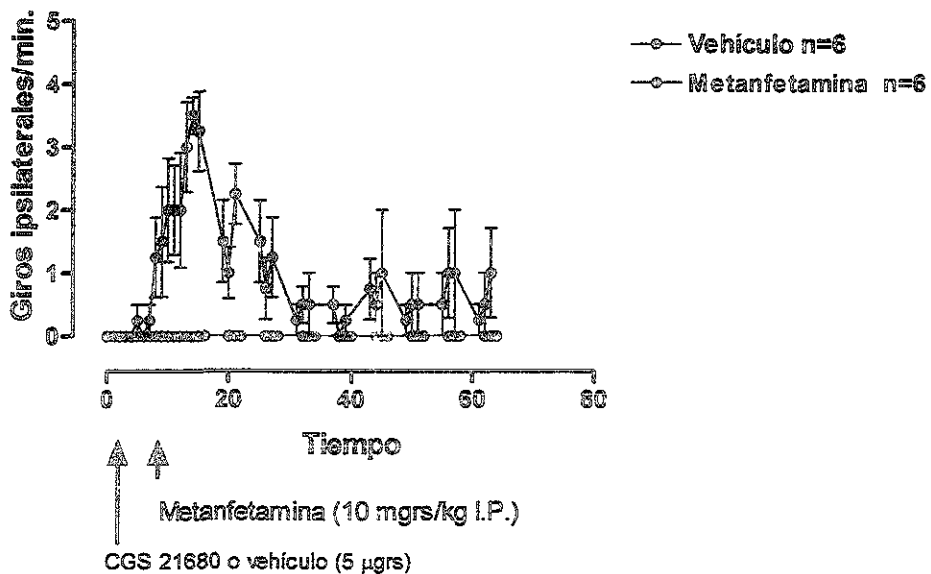


Fig.9. La activación de receptores A_{2A} palidales requiere de la activación de los receptores dopaminérgicos. La gráfica muestra el efecto de la aplicación intrapalidal de 5 µgrs de CGS 21680 o su vehículo en ratas a las que posteriormente se les aplico metanfetamina por vía sistémica. El registro en este caso se realizó por 80 minutos y se muestra el resultado del número de animales ± el error estándar indicados en la gráfica.

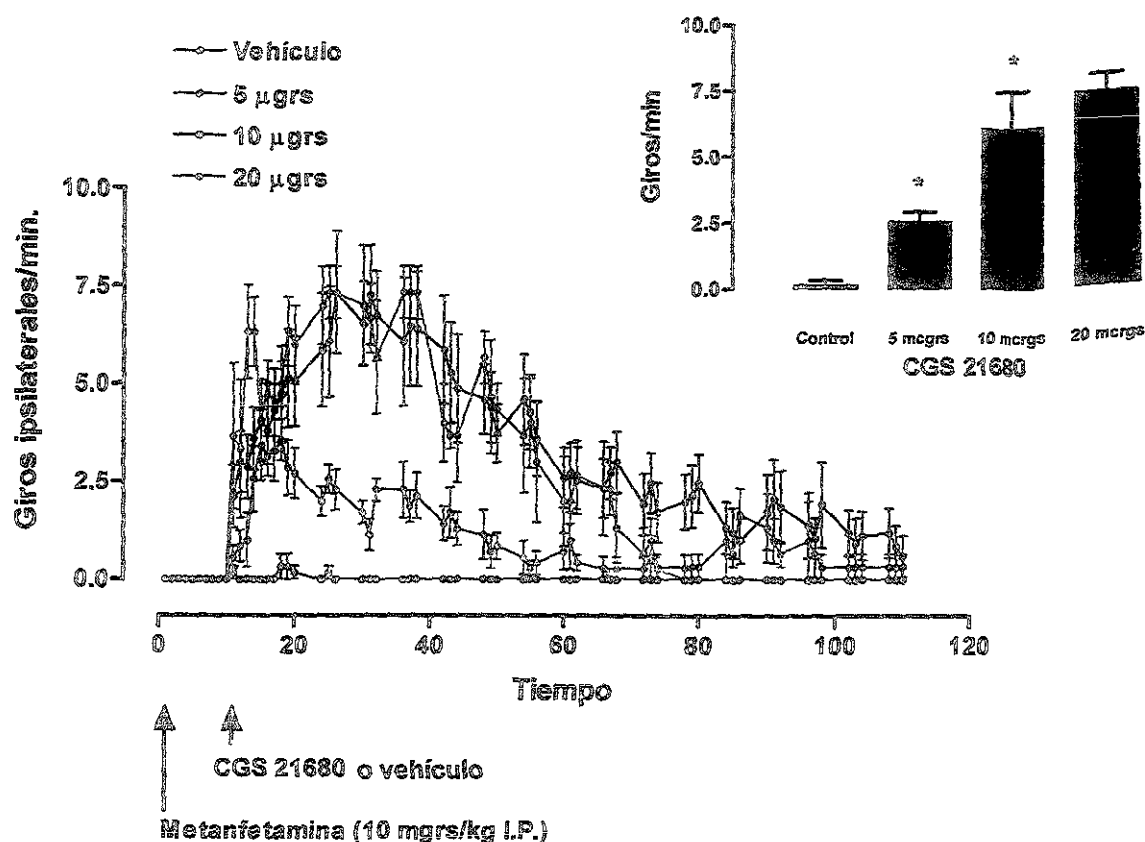


Fig. 10. Dependencia de la dosis del efecto del CGS 21680 intrapalidal. La gráfica muestra el resumen de los experimentos en los que se aplicaron diferentes dosis de CGS 21680 a ratas tratadas previamente con metanfetamina por vía sistémica. El registro se continuó por dos horas, se muestra el promedio \pm el error estándar del número de giros por minuto al tiempo indicado. El inserto muestra la velocidad de giros máxima que se obtiene a los 30 minutos de aplicado el CGS en el globo pálido a las diferentes dosis administradas.

9.3 Efecto del bloqueo de los receptores A_{2A} palidales sobre la respuesta a la metanfetamina.

La actividad de adenosina endógena que pudiera generarse en la activación de los receptores dopaminérgicos con la maniobra de la administración con metanfetamina se evaluó por la administración intrapalidal de un antagonista selectivo de los receptores A_{2A} el ZM 241385. La figura 11 muestra el resultado de estos experimentos. El ZM 241385 no produjo un desbalance motor que se manifestase como conducta de giro al bloquear los receptores A_{2A} palidales en ratas previamente tratadas con metanfetamina, sugiriendo que no hay suficiente

adenosina endógena. Es importante mencionar que el ZM 241385 es capaz de reducir la actividad locomotora generalizada que es estimulada por la metanfetamina (datos no mostrados) y que la sola administración del ZM 241385 intrapalidal (es decir sin tratamiento con metanfetamina) no produce conducta de giro (datos no ilustrados).

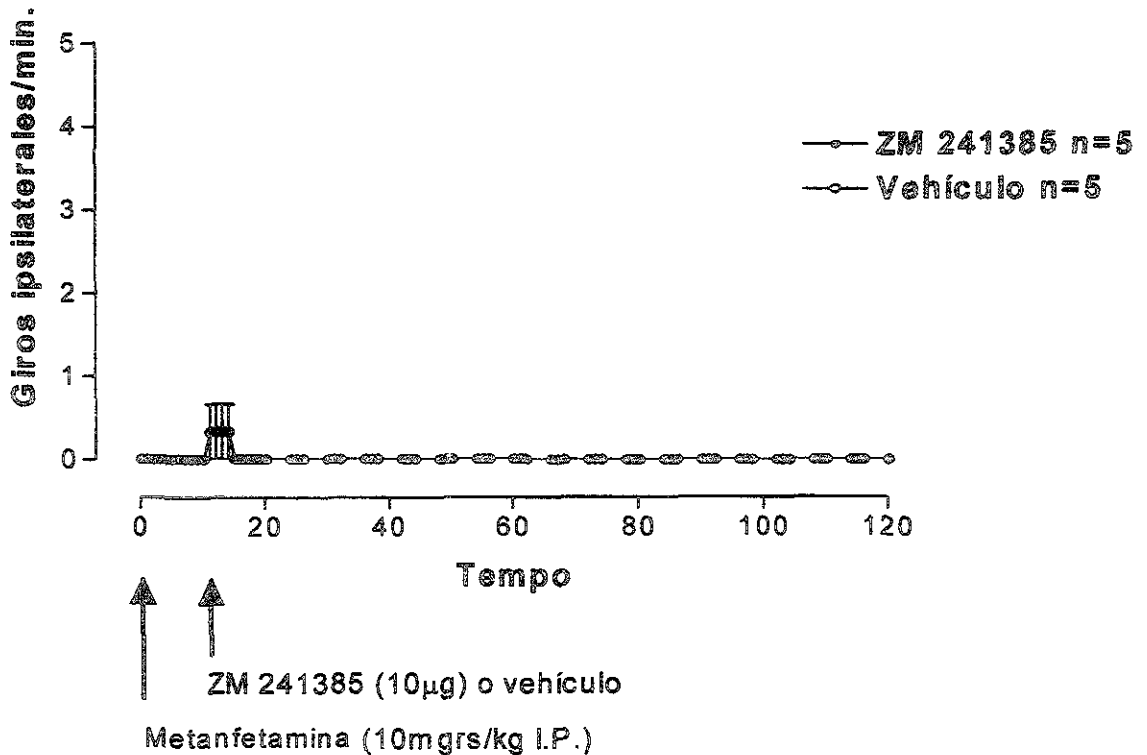


Fig. 11. El bloqueo de los receptores A_{2A} palidales no produce giro en ratas tratadas con metanfetamina. La grafica muestra la falta de efecto de la administración intrapalidal de 10 µgrs de l antagonista de los receptores A_{2A} ZM 241385. Se registro inclusive mas allá de tres horas después de la aplicación. Se grafica el promedio ± el error estándar.

9.4 Efecto del bloqueo de los receptores D_2 y A_{2A} sobre el efecto del CGS 21680 intrapalidal.

Con el objeto de obtener más evidencia de la dependencia del efecto del CGS 21680 de la activación de los receptores D_2 , se estudio el efecto del bloqueo sistémico de estos receptores sobre la respuesta de la aplicación intrapalidal del CGS 21680. Para ello, previo a la aplicación de la metanfetamina, sistémicamente bloqueamos los receptores D_2 por la administración de 17 (mgrs/kg s.c.) de l-sulpiride. Los resultados de la figura 12 muestran que el bloqueo de estos receptores previene el efecto del CGS 216380 intrapalidal indicando que el efecto del CGS 21680 depende de la activación previa de los receptores D_2 .

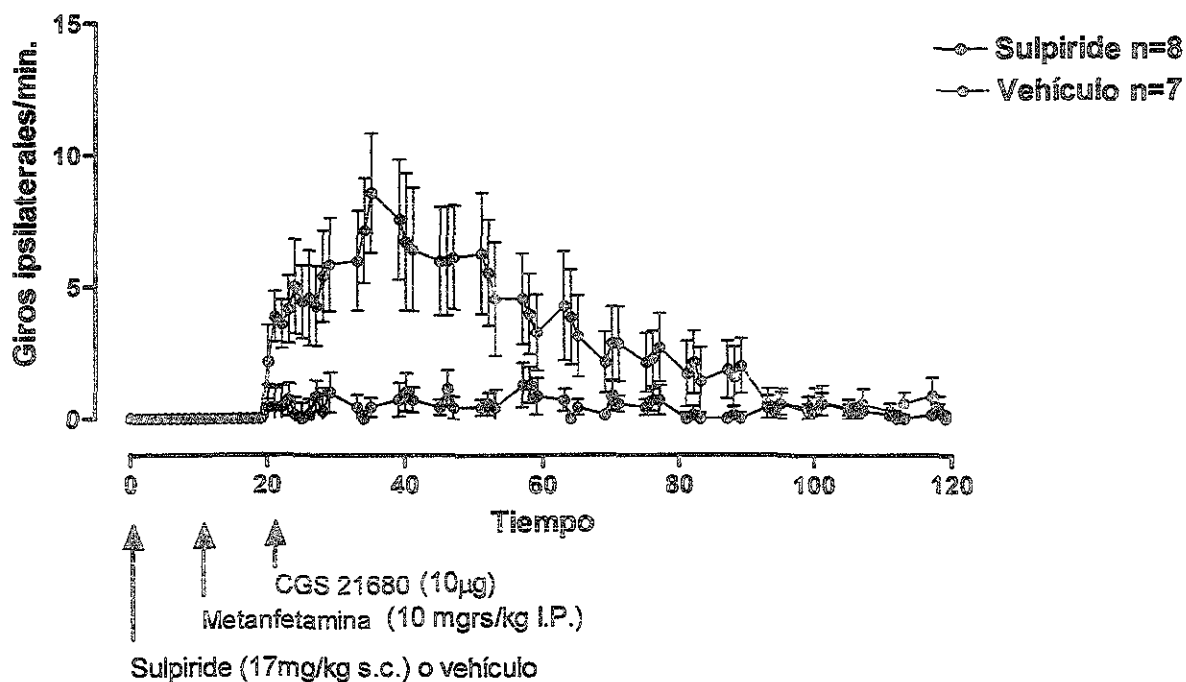


Fig. 12. El bloqueo de los receptores D_2 con l-sulpiride previene el giro inducido por la activación de los receptores A_{2A} palidales. La gráfica muestra el resultado de l bloqueo de los receptores D_2 con l-sulpiride por vía sistémica sobre la activación de los receptores A_{2A} palidales con CGS 21680. Como grupo control se administro el vehículo, en lugar del l-sulpiride. Se grafica el promedio \pm el error estándar.

Con objeto de obtener más evidencia de que el CGS 21680 induce conducta de giro activando receptores A_{2A} , se comprobó si su efecto puede ser prevenido por el bloqueo de los receptores A_{2A} con un antagonista selectivo. Dada la toxicidad reportada para el ZM 241385 y el vehículo en el que se diluye, probamos CSC un antagonista que no presenta estos inconvenientes. Los resultados de la figura 13 muestran el resultado del bloqueo de los receptores A_{2A} con CSC por vía sistémica. El cual previene el efecto del CGS 21680 intrapalidal en ratas previamente tratadas con metanfetamina. Esto indica que el efecto del CGS 21680 está mediado por receptores farmacológicamente correspondientes a receptores A_{2A} .

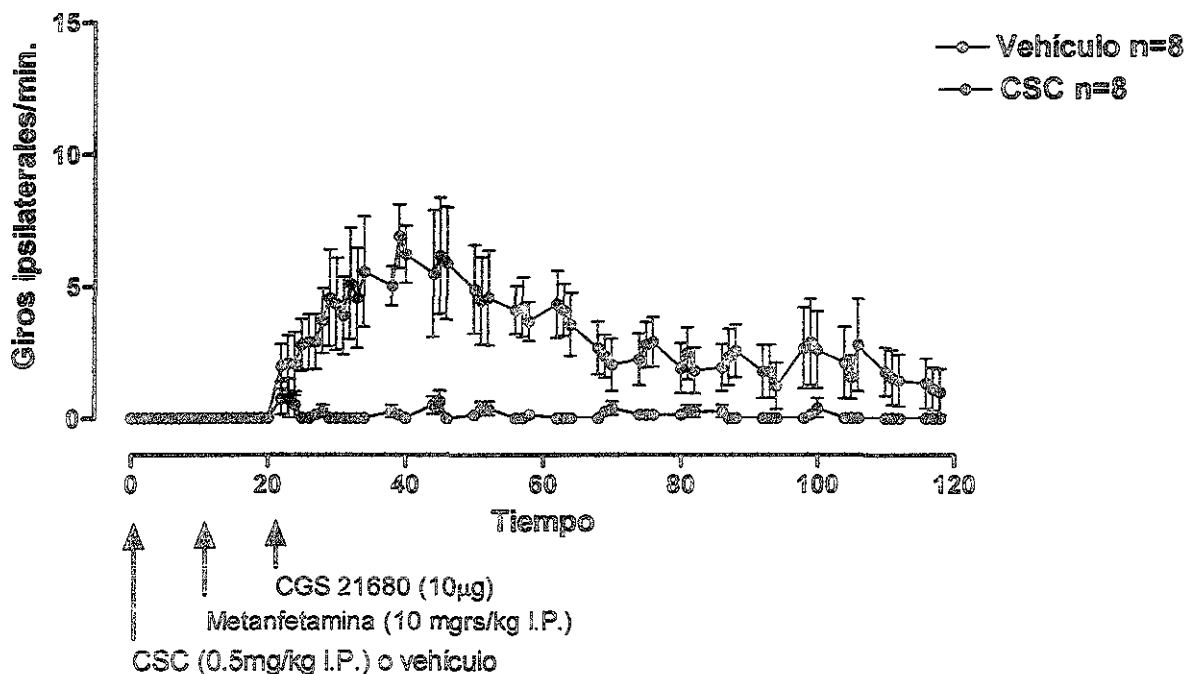


Fig. 13. El bloqueo de los receptores A_{2A} con CSC previene el giro inducido por la activación de los receptores A_{2A} palidales. La gráfica muestra el resultado del bloqueo de los receptores A_{2A} por vía sistémica con el antagonista selectivo CSC sobre la activación de los receptores A_{2A} palidales con CGS 21680. Como grupo control se administró el vehículo, en lugar del CSC. Se grafica el promedio \pm el error estándar.

9.5 Verificación histológica de los sitios de inyección

En la figura 14 se muestran algunos de los sitios representativos, donde quedaron las puntas de la cánulas de inyección dentro del globo pálido.

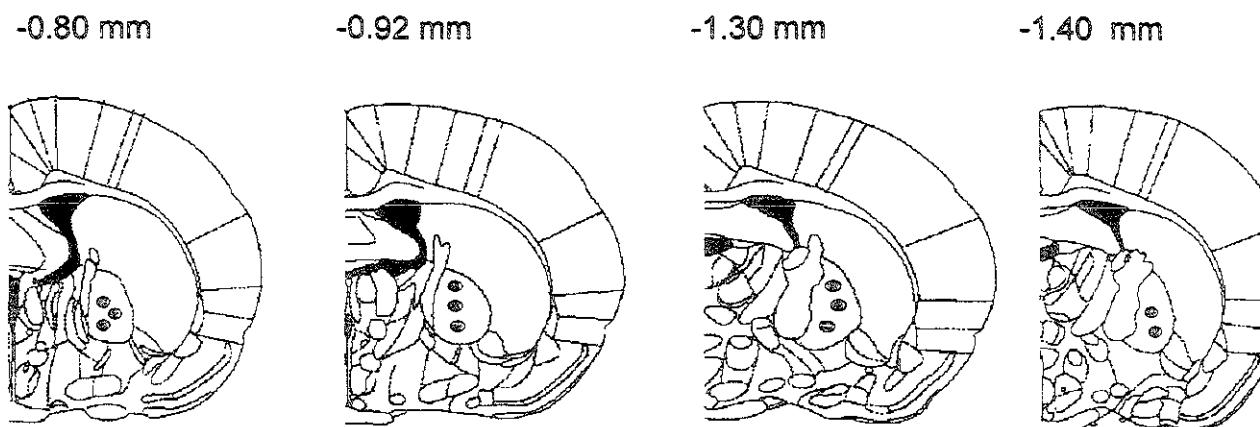


Fig. 14. Esquemas de cortes coronales de cerebro de rata (tomado de Paxinos & Watson, 1998) donde se muestra la ubicación de las puntas de las cánulas de inyección para la aplicación de agonistas dopaminérgicos y agonistas y antagonistas adenosinérgicos en el globo pálido.

10. DISCUSIÓN

10. 1 En relación a la preparación.

Uno de los objetivos iniciales del presente trabajo fue contar con una preparación en la que pudiéramos estudiar la interacción dopamina-adenosina en el animal íntegro. La mayor parte de los estudios conductuales relacionados con el tema administran drogas agonistas y antagonistas de manera sistémica sin importar el sitio donde se encuentran los receptores (Rimondini, Ferré, Giménez-Llort, Oven-Ögren y Fuxe, 1998; Popoli, Giménez-Llort, Pezzola, Regio, Martínez, Fuxe y Ferré, 1996; Popoli, Pèzzola y Scotti de Carolis, 1994). Estos tienen la desventaja de que además de que pueden presentarse efectos no específicos de los fármacos no relacionados con la actividad de los receptores, se desconoce si el efecto observado está o no en función con la actividad de núcleos específicos involucrados con la actividad motora. En nuestro trabajo decidimos resolver estos problemas por medio de la aplicación de los agonistas de manera directa al globo pálido externo, que está directamente relacionado con el control motor (Costall, Naylor y Olley, 1972c; Meyer, Cottrell y Van Hartesveldt, 1993; Fletcher y Starr, 1988; Hauber, *et al.*, 1999). Por otro lado, podríamos haber administrado agonistas para dopamina de manera directa al globo pálido también y activar los receptores, sin embargo datos de la literatura (Arnr. 1985; Barone, Davis, Braun y Chase, 1986; Braun y Chase, 1986; Mashurano y Waddington, 1986) indican que para observar una conducta motora equivalente a la que produce la dopamina en condiciones normales se deben de activar ambos sistemas de receptores los D₁ y los D₂, por ello decidimos primero

activar ambos subsistemas de receptores de manera generalizada y segundo usar la propia dopamina endógena, para ello se usó una administración que produce la estimulación directa de ambos tipos de receptores. También decidimos que esta manera de activar los receptores de dopamina elimina las dificultades técnicas que implica la administración de dos inyecciones a través de la cánula y el daño al tejido.

La evidencia de que la maniobra de la metanfetamina activa los receptores D_2 palidales, es a través de la conducta de giro que induce el l-sulpiride al administrarse intrapalidalmente. Dado el bloqueo de los receptores D_2 que normalmente inhiben la salida de GABA en este núcleo, el sulpiride aumentaría la transmisión GABAérgica lo que conlleva a inhibición de las neuronas palidales y a un aumento de la actividad subtalámica (Floran, Floran, Sierra y Aceves, 1997; Mayfield, Larson, Orona y Zahniser, 1996; Querejeta, Delgado, Valdiosera, Erij y Aceves, 2001). De acuerdo al esquema de organización funcional de los ganglios basales (Albin, *et al.*, 1989; Garrett, *et al.*, 1990) el incremento de actividad subtalámica estimula más a los núcleos de salida y el freno que éstos hacen sobre el tálamo de manera, que ahora este no puede estimular a la corteza motora disminuyendo su actividad del lado de la aplicación y apareciendo la conducta de giro. Estudios *in vitro* refuerzan esta idea, pues se ha mostrado en rebanadas de globo pálido que el l-sulpiride incrementa la liberación de GABA al bloquear la acción de dopamina endógena (Floran, *et al.* 1997). Con esto pues contamos con una preparación en la están activos los receptores D_2 *in vivo* y podemos estudiar la acción de la adenosina y su interacción con la dopamina a través de los receptores A_{2A} .

10.2 *Papel de la adenosina en el globo pálido.*

Nuestros resultados apoyan ampliamente la idea de una modulación adenosinérgica de la actividad dopaminérgica en el globo pálido de la rata. Las bases para suponer son nuestros resultados experimentales y los datos de la literatura (Mayfield, *et al.*, 1996; Ferré, *et al.*, 1997; Fuxe, *et al.*, 1998; Svenningsson, Fourreau, Bloch, Fredholm, Gonon y Le Moine, 1999; Ferré, O'Conor, Fuxe y Ungerstedt, 1993; Le Moine, Svenningsson, Fredholm y Bloch, 1997; Khisti, Chopde y Abraham, 2000).

Primeramente, en la rata sin metanfetamina, la activación de los receptores A_{2A} no modula la actividad locomotora, lo que se desprende de los experimentos no mostrados (piloto) en los que la administración del CGS 21680 intrapalidal no es capaz de inducir conducta de giro y datos de la figura 9, en donde el CGS 21680 se administró antes de la metanfetamina. Esto indicaría que la adenosina por si sola no modificaría la transmisión GABAérgica del globo pálido, lo cual ha sido reportados en los estudios *in vitro* tanto de liberación como de electrofisiología (Floran, *et al.*, 2001, datos no publicados).

El registro de una actividad dopaminérgica incrementada para ver efectos de la adenosina se hace obvia en el momento en que se agrega la metanfetamina y se induce conducta de giro (figura 9), lo mismo sucede cuando se agrega previamente la metanfetamina (figura 8). El sentido del giro (ipsilateral) indica que la actividad de la corteza motora del lado del sitio de la aplicación está disminuida, lo cual puede explicarse porque la adenosina, al promover la liberación de GABA en el globo pálido, inhibe las neuronas pálido-subtalámicas, con lo que el subtálamo queda

desinhibido y estimula a los núcleos de salida. La estimulación de la sustancia nigra reticulada y/o globo pálido interno inhibe al tálamo y en consecuencia éste no puede activar a la corteza motora (figura 15). Varias líneas de investigación apoyan esta idea, primero los experimentos *in vitro* en donde se ha mostrado el cambio en la afinidad de los receptores D₂ por activación de los A_{2A} (Ferre, Euler, Johansson, Fredholm y Fuxe, 1991; Florán, *et al.*, 2001). Esto sugiere que cuando se activen conjuntamente los D₂ y los A_{2A} se modifica la afinidad de los primeros, dando como resultado una menor inhibición de la liberación de GABA en el pálido que si se compara con la del lado donde no se administró el CGS 21680 da como resultado una asimetría motora que se traduce en giro. Por otro lado estudios conductuales han mostrado que los antagonistas A_{2A} potencian enormemente los efectos de la anfetamina, apomorfina, y agonistas D₁ y D₂ selectivos cuando se administran por vía sistémica (Popoli, *et al.*, 1994; Ferré, *et al.*, 1997; Golembiowska y Zylewska, 1998; Popoli, Regio y Pèzzola, 2000).

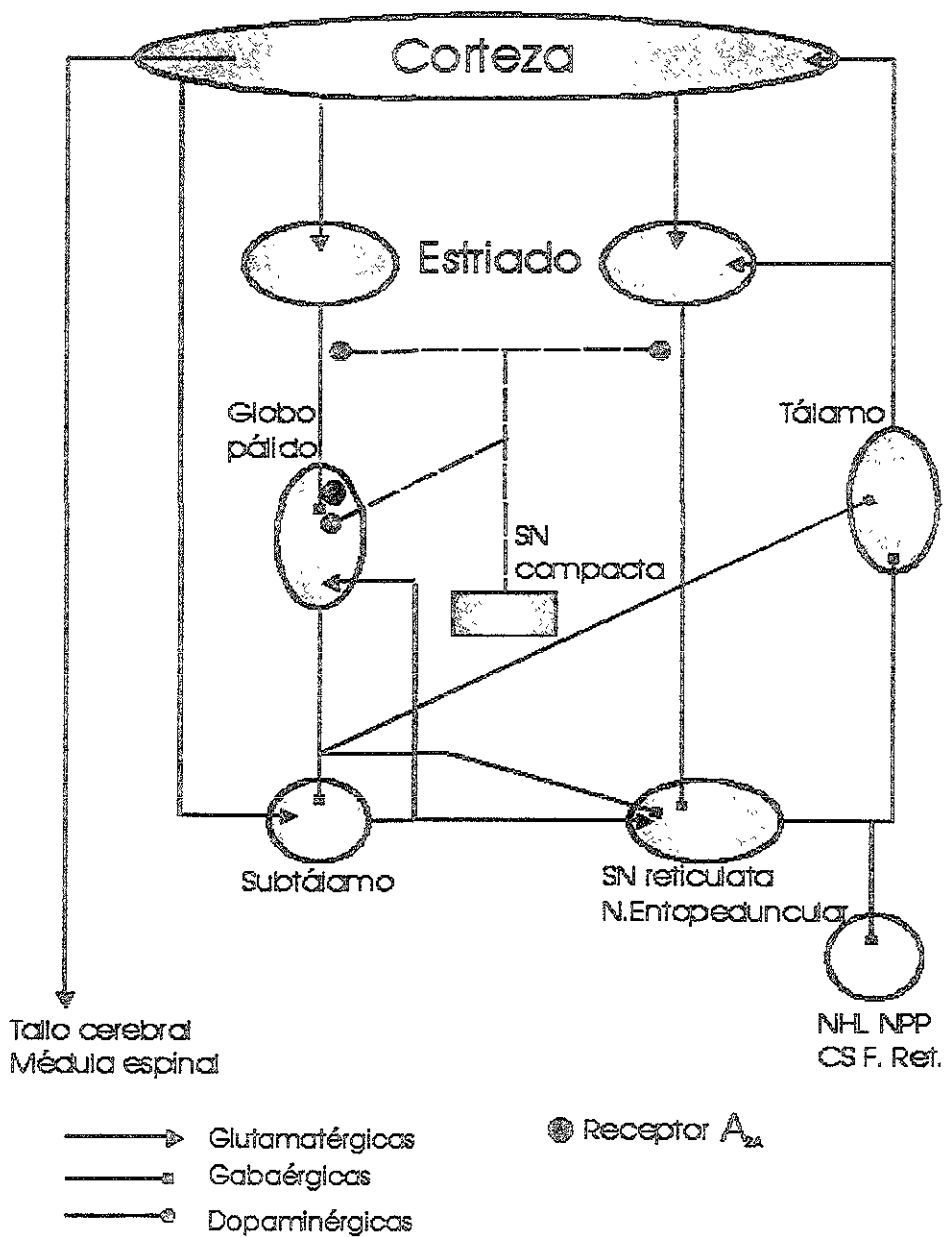


Fig. 15. Esquema representativo de los ganglios basales denotando la ubicación del receptor A_{2A} en la terminal estriato-palidal, donde estaría regulando la liberación de GABA, a través de un receptor D_2 de dopamina.

El hecho de que el efecto de la adenosina esté mediado por receptores D₂ también se evidencia en la desaparición del efecto del CGS 21680 ante el pretratamiento con l-sulpiride (figura 12). Datos de la literatura (Ferré, *et al.*, 1997) apoyan esta idea, dado que los efectos conductuales resultado de la administración de agonistas D₂ selectivos se bloquean por la administración de agonistas A_{2A} y viceversa.

La especificidad farmacológica del CGS 21680 y sus efectos a través de receptores A_{2A} queda demostrada en la figura 13 en donde el CSC (un antagonista selectivo de los receptores A_{2A}) previene el efecto del CGS 21680.

Por último cabría esperar que un antagonista selectivo de los receptores A_{2A} produjera un giro opuesto al CGS 21680, cuando se administra intrapalidalmente. En los experimentos ilustrados en la figura 11, encontramos que esto no ocurre así. Varias consideraciones debemos hacer al respecto. Primeramente, las dificultades técnicas con la solubilidad de estos compuestos como el usado, el ZM 241385 (Chen, Beilstein, Xu, Turner, Moratalla, Standaert, Aloyo, Fink y Schwarzschild, 2000), hace difícil experimentar con mayores dosis sin aumentar la concentración del vehículo, el cual a mayores concentraciones puede por sí solo provocar efectos conductuales quedando la duda si dosis mayores pudieran inducir giro contralateral. Sin embargo, consideramos que esto no es el caso, dado que la potencia del ZM 241385, reportada *in vitro* es muy elevada (Ongini, Dionisotti, Gessi, Irenius, Fredholm, 1999) y extrapolando a la cantidad usada *in vivo* el efecto es específico. Por otro lado para provocar giro contralateral, además de administrar metanfetamina para liberar dopamina endógena, el sistema debe contar con suficiente adenosina endógena que estimule los receptores A_{2A} y el antagonista

origine un desbalance (Popoli, *et al.*, 1994). Esto implica que probablemente en esta condición *in vivo* es diferente a la reportada *in vitro*, y que no hay suficiente adenosina endógena.

En resumen nuestros datos corroboran la interacción dopamina adenosina *in vivo* destacando que esta interacción es determinante para el control motor en el que el globo pálido está involucrado.

10.3 Implicaciones para el Parkinson.

El uso de antagonistas A_{2A} con fines terapéuticos en el Parkinson se basa en la hiperactividad que se produce en su administración por la vía sistémica y en el poder invertir la hipocinesia mostrada en algunos modelos de Parkinson experimental (Koga, Kurokawa, Ochi, Nakamura y Kuwana, 2000).

Ante ello cabe hacer algunas reflexiones. Primero los modelos de Parkinson experimental sugieren que existe una hiperactividad de la vía indirecta sobre la directa en los trastornos hipocinéticos como la enfermedad de Parkinson (Albin, *et al.*, 1989). Por lo tanto los receptores D₂ que modulan la transmisión GABAérgica de esta vía están sobre-expresados, por lo que surge la pregunta ¿Cómo una droga que requiere presencia de dopamina, puede ser útil en una enfermedad en donde falta este neurotransmisor? Y una más ¿Cómo puede restaurar la transmisión GABAérgica al nivel previo a la pérdida de dopamina?

La primera pregunta es importante para la terapéutica potencial con estos compuestos, dado los resultados de este trabajo y datos de la literatura (Ferré, Popoli, Giménez-Llorç, Rimondini, Müller, Strömberg, Ove Ögren y Fuxe, 2001;

Richardson, Kase y Jenner, 1997; Kanda, Jackson, Smith, Paerce, Najamura, Kase, Kuwana y Jenner, 1998; Grondin, Bédard, Tahar, Grégoire, Mori y Kase, 1999), la utilidad de estos compuestos requiere dopamina, por lo que proponemos que para el tratamiento del Parkinson los antagonista A_{2A} deberán ser administrados conjuntamente con l-dopa o un agonista D₂ como la bromocriptina. Ahora bien dado el cambio en la sensibilidad del receptor D₂ que produce los receptores A_{2A} se podría disminuir la dosis de l-dopa y de esta manera prevenir la aparición o por lo menos alargar el tiempo de aparición de los efectos indeseables.

Para la segunda pregunta es todavía más difícil entender cómo puede ocurrir ya que si los antagonistas al bloquear la adenosina endógena aumentan la sensibilidad del receptor D₂, ¿podrá esto a la larga disminuir la sobre-expresión de la vía indirecta y llevar el número de receptores a niveles anteriores a la denervación?. No lo sabemos, pero consideramos que el estudio de la interacción dopamina-adenosina debe pasar ahora al animal denervado para estudiar esta posibilidad. Lo mismo debe ocurrir para el estudio que evalúe el potencial terapéutico de estos compuestos.

11. CONCLUSIONES

1. La administración sistémica de metanfetamina estimula la activación de receptores D₂ palidales
2. La activación *per se* de los receptores A_{2A} palidales no afecta la conducta motora de la rata.
3. La co-activación de los receptores D₂ y A_{2A} palidales modifica la actividad motora de la rata al interactuar de manera antagónica.
4. El efecto de la adenosina a través de receptores A_{2A} palidales requiere de la activación de los receptores dopaminérgicos D₂ *in vivo*.

12. REFERENCIAS

1. Albin, L. R., Young, A. B., y Penney, J. B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neuroscience*. 12: 366-374.
2. Arnt, J. (1985). Behavioural stimulation induced by separate dopamine D-1 and D-2 receptor sites in reserpine-pretreated but not in normal rats. *European Journal of Pharmacology*. 113:79-88
3. Arnt, J., Hyttel, J. y Perregaard. (1987). Dopamine D-1 receptor agonista combined with the selective D-2 agonist quinpirole facilitate the expresión of oral stereotyped behaviour in rats. *European Journal of Pharmacology*. 133:137-145.
4. Bahena-Trujillo, R., Flores, G. y Arias-Montaño, J.A. (2000). Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el sistema nervioso central. *Rev Biomed*. 11:39-60
5. Barone, P., Davis, T. A., Braun, A. R. y Chase, T. N. (1986). Dopaminergic mechanisms and motor functions: characterization of D-1 and D-2 dopamine receptor interactions. *European Journal of Pharmacology*. 123:109-114.
6. Brailowsky, S. y Gracia-Muñoz, A. (1996). Historia natural de la enfermedad de Parkinson. En: E. Otero-Siliceo. (editor). Parkinson: Enfoque al Futuro. México: Fondo de Cultura Económica
7. Braun, A. R. y Chase, T. N. (1986). Obligatory D-1/D-2 receptor interactions in the generation of dopamine agonists related behaviours. *European Journal of Pharmacology*. 131:301-306.
8. Carpenter, M. B. (1991). Neuroanatomía fundamentos. 4ª edición. Editorial Medica Panamericana.
9. Casas, M., Prat, G., Robledo, P., Barbanoj, M., Kulisevsky, J. y Jané, F. (1999). Repeated co-administration of caffeine and bromocriptine prevents tolerance to the effects of caffeine in the turning behavior animal model. *European Neuropsychopharmacology*. 9:515-525.
10. Chen J.F., Beilstein M., Xu Y.H., Turner T.J., Moratalla R., Standaert D.G., Aloyo V.J., Fink J.S. y Schwarzschild M. A. (2000). Selective attenuation of psychostimulant-induced behavioral response in mice lacking A_{2A} adenosine receptors. *Neuroscience*. 97:195-204.
11. Chesselet, M. F. y Delfs, J. M. (1996). Basal Ganglia and movement disorders: an update. *Trens in Neuroscience*. 19(10):417-422.
12. Costall, B., Naylor, R. J. y Olley, J. E. (1972a). Catalepsy and circling behavior after intracerebral injections of neuroleptic, cholinergic and anticholinergic agents into the caudate-putamen, globus pallidus and sustancia nigra of rat brain. *Neuropharmacology*. 11:645-663.
13. Costal, B., Naylor, R. J. Y Olley, J. E. (1972b). On the involvement of the caudate-putamen, globus pallidus and sustancia nihra with neuroloptic and cholinergic modification of locomotor activity. *Neuropharmacology*. 11:317-330.
14. Costall, B., Naylor, R. J. y Olley, J. E. (1972c). Stereotipic and anticataleptic activities if amphetamine after intracerebral injections. *Eurepean Journal of Pharmacology*. 18(1):83-84.

15. Felman, R. S., Meyer, J. S., Quenzaer, L. F. (1997). Principles of Neuropsychopharmacology. Sinauer Associates, Inc., Publishers.
16. Ferré, S., O'Connor, W. T., Fuxe, K. y Ungerstedt, U. (1993). The striapallidal neuron: A main locus for Adenosine- Dopamine interactions in the Brain. *The Journal of Neuroscience*. 13(12):5402-5406.
17. Ferré, S., Euler, G. V., Johansson, B., Fredholm, B. y Fuxe, K. (1991). Stimulation of high affinity adenosine A₂ receptors decreases the affinity of dopamine D₂ receptors in rat striatal membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88:72338-7241.
18. Ferré, S., Fredholm B. B., Morelli M., Popoli P. y Fuxe K. (1997). Adonisine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *TINS*. 20:482-487.
19. Ferré, S., Fuxe, K., Von Euler, G., Johanson, B. y Fredholm, B. (1992). Adenosine-Dopamine interactions in the brain. *Neuroscience*. 51:501-512.
20. Ferré, S., Popoli, P., Giménez-Llort, L., Rimondini, R., Müller, C. E., Strömberg, I., Ove Ögren, S. y Fuxe, K. (2001). Adenosine/Dopamine interaction: implications for treatment of Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders*. 7:235-241.
21. Ferré, S., Rubio, A. y Fuxe, K. (1991). Stimulation of adenosine A_{2A} receptors induce catalepsy. *Neuroscience Letters*. 130:162-164.
22. Fletcher, G. H. y Starr, M. S. (1988). Intracerebral SCH 23390 and catalepsy in the rat. *European Journal of Pharmacology*. 149(2-3):175-178.
23. Floran, B., Floran, L., Sierra, A., y Aceves, J. (1997). D₂ receptor-mediated inhibition of GABA release by endogenous dopamine in the rat globus pallidus. *Neuroscience Letters*. 237:1-4.
24. Fuxe, K., Ferré, S., Zoli, M. y Agnati, L. F. (1998). Integrated events in central dopamine transmiión at multiple levels. Evidence for intramembrane adenosine A_{2A}/dopamineD₂ and adenosine A₁/dopamine D₁ receptor interactions in the basal ganglia. *Brain Research Reviews*. 26:258-273
25. Garrett., E. A. y Crutcher, M. D. (1990). Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parellel processing. *Trends Neuroscience* 13:266-270.
26. Gerfen C., Engber T. M., Maham L. C., Susel Z., Chase T. N., Monsma F.J., y Sibley D. R. (1990). D₁ and D₂ dopamina receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science*. 250:1429-1432.
27. Golembiowska, K. y Zylewska, A. (1998). Agonista of A₁ and A_{2A} adenosine receptors attenuate methamphetamine-induced overflow of dopamine in rat striatum. *Brain Research*. 806:202-209.
28. Graybiel, A. M. (2000). The basal ganglia. *Current Biology*. 10(14):509-511.
29. Grondin, R., Bédard, P. J., Tahar, a. H., Grégoire, L., Mori, A. y Kase, H. (1999). Antiparkinsonian effect of a new selective adenosine A_{2A} receptor antagonist in MPTP-treated monkeys. *Neurology*. 52:1673-1677.
30. Hauber W. (1998). involvement of basal ganglia transmitter systems in movement initiation. *Progress in Neurobiology*. 56:507-540

31. Hauber, W., Lutz, S. (1999). Dopamine D1 or D2 receptor blockade in the globus pallidus produces akinesia in the rat. *Behavioural Brain Research*. 106:143-150.
32. Hauber, W., Lutz, S. y Münkler, M. (1998). The effects of globus pallidus lesions on dopamine-dependent motor behaviour in rats. *Neuroscience*. 86(1):147-157.
33. Hauber, W., Nagel, J., Sauer, R. y Müller, S. E. (1998). Motor effects induced by a blockade of adenosine A_{2A} receptors in the caudate-putamen. *Neuroreport*. 9(81):1083-1806.
34. Hauber, W., y Fuchs, H. (2000). Dopamine release in the rat globus pallidus characterised by *in vivo* microdialysis. *Behavioural Brain Research*. 111:39-40
35. Kanda, T., Jackson, M. J., Smith, L. A., Paerces, R. K. B., Nakamura, J., Kase, H., Kuwana, Y. y Jenner, P. J. (1998). Adenosine A_{2A} antagonist: a novel antiparkinsonian agent that does not provoke dyskinesia in parkinsonian monkeys. *Annual Neurol*. 43:507-513.
36. Kandel, E. R.; Schwartz, J. H. y Jessel, T. M. (1996). Principles of neural science. 3rd. Edition. New york: Elsevier.
37. Keibabian, J. W. y Clane, D. B. (1979). Multiple receptors for dopamine. *Neuroscience*. 4:93-96.
38. Khisti R.T., Chopde C.T., Abraham E. (2000). GABAergic involvement in motor effects of adenosine A_{2A} receptor agonist in mice. *Neuropharmacology* 39:1004-1015.
39. Koga, K., Kurokawa, M., Ochi, M., Nakamura, J. y Kuwana, Y. (2000). Adenosine A_{2A} receptor antagonists KF17837 and KW-6002 potentiate rotation induced by dopaminergic drugs in hemi-Parkinsonian rats. *European Journal of Pharmacology*. 408:249-255.
40. Le Moine, C., Svenningsson, P., Fredholm, B. B. y Bloch, B. (1997). Dopamine-Adenosine interactions in the striatum and globus pallidus: inhibition of striatopallidal neurons through either D2 or A_{2A} receptors enhances D1 receptor-mediated effects on *c-fos* expression. *The Journal of Neuroscience*. 17(20):8038-8048.
41. Le Moine, C., Svenningsson, P., Fredholm, B. B. y Bloch, B. (1997). Dopamine-Adenosine interactions in the striatum and the globus pallidus: inhibition of striatopallidal neurons through either D2 or A_{2A} receptors enhances D1 receptors-mediated effects on *c-fos* expression. *The Journal of Neuroscience*. 17(20)8038-8048.
42. Levey, A. I., Hersch, S. M., Rye, D. B., Sunahara R. K., Niznik, H. B., Kitt, C. A., Price, L. L., Maggio R., Brann, M. R. y Ciliax, B. J. (1993). Localization of D1 and D2 dopamine receptors in brain with subtype-specific antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90:8861-8865.
43. Lindvall, O. y Björklund, A. (1979). Dopaminergic innervation of the globus pallidus by collaterals from the nigrostriatal pathway. *Brain Research*. 172(1):169-173.
44. Löschmann, P. A., Smith, L. A., Lange, K. W., Jähnig, P., Jenner, P., y Marsden, C. D. (1992). Motor activity after the administration of selective D-1 and D-2 dopaminergic drugs to MPTP-treated common marmosets. *Psychopharmacology*. 109:49-56

45. Mahlon R. D. (1990). Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neuroscience*. 7:281-285.
46. Mashurano , M. y Waddington, J. L. (1986). Stereotyped behaviour in response to selective D-2 dopamine receptor agonist RU24213 is enhanced by pretreatment with the selective D-1 SK&F 38393. *Neuropharmacology*. 25:947-949.
47. Mayfield, R. D., Larson, G., Orona, R. A. y Zahniser, N. R. (1996). Opposing actions of adenosine A_{2A} and dopamine D₂ receptors activation on GABA release in the basal ganglia: evidence for an A_{2A}/D₂ receptor interactions in globus pallidus. *Sinapse*. 22:132-138.
48. Meyer, M. E., Cottrell, G. A. y Van Hartesveldt, C. (1993). Intracerebral haloperidol potentiates the dorsal immobility response in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*. 44(1):157-160.
49. Moreau., J-L., y Huber, G. (1999). Central adenosine A_{2A} receptors: an overview. *Brain Research Reviews*. 31:65-82.
50. Morelli M., Fenu S., Cozzolino A., y Di Chiara. (1991). Positive and negative interactions in the behavioural expression of D₁ and D₂ receptor stimulation in a model of Parkinsonism: role of priming. *Neuroscience*. 42:41-48.
51. Nobin, A., y Björklund, A. (1973). Topography of the monoamine neuron systems in the human brain as revealed in fetuses. *Acta Physiol Scand Suppl*. 388:1-40.
52. Oghi, M., Koga, K., Kurokawa, M., Kase, H., Nakamura, J. y Kuwana, Y. (2000). Systemic administration of adenosine A_{2A} receptor antagonist reverses increased GABA release in the globus pallidus od unilateral 6-hydroxydopamine-lesioned rats: a microdialysis study. *Neuroscience*. 100(1):53-62.
53. Ongini, E., Dionisotti, S., Gessi, S., Irenius, E. y Fredholm, B. B. (1999). Comparison of CGS 15943, ZM 241385 and SCH 58291 as antagonists at human adenosine receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 359:7-10.
54. Parret A. (1986). Comparative Neurobiology of the basal Ganglia. Wiley-Interscience.
55. Paxinos, R. A. y Watson, Ch. (1998). The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, New York.
56. Popoli, P., Giménez-Llort, L., Pezzola, A., Regio, R., Martínez, E., Fuxe, K. y Ferré, S. (1996). Adenosine A₁ receptor blockade selectively potentiates the motor effects induced by dopamine D₁ receptor stimulation in rodents. *Neuroscience Letters*. 218:209-213.
57. Popoli, P., Pèzzola, A. y Scotti de Carolis, A. (1994). Modulation of striatal adenosine A₁ and A_{2A} receptors induce rotational behaviour in response to dopaminergic stimulation in intact rats. *Eurepean Journal of Pharmacology*. 527:201-204.
58. Popoli, P., Reggio, R. y Pèzzola, A. (2000). Effects of SCH 58261, an adenosine A_{2A} receptor antagonist, on quinpirole-induced turning in 6-Hydroxydopamine-lesioned rats: lack of tolerance after chronic caffeine intake. *Neuropsychopharmacology*. 22:522-529.

59. Popoli, P., Reggio, R., Pèzzola, A., Fuxe, K. y Ferré, S. (1998). Adenosine A₁ and A_{2A} receptor antagonists stimulate motor activity: evidence for an increased effectiveness in aged rats. *Neuroscience Letters*. 251:201-204.
60. Przedborski, S., Levivier, M., Jiang, H., Ferreira, M., Jackson-Lewis, V., Donalson, D y Togasaki, M. (1995). Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induce by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience*. 3:631-947.
61. Querejeta, E., Delgado, A., Valdiosera, R., Eriij, D. y Aceves, J. Intrapallidal D2 dopamine receptors control globus pallidus neuron activity in the rat. *Neuroscience Letters*. (2001)300:79-82.
62. Ribeiro, J. A. (1999). Adenosine A_{2A} receptor interactions with receptors for other neurotransmitters and neuromodulators. *European Journal of Pharmacology*. 375:101-113.
63. Richardson, P. J., Kase, H. y Jenner, P.G. (1997). Adenosine A_{2A} receptor antagonists as mew agents for the treatment of Parkinson's disease. *TIPS* 18:338-344.
64. Rimondini, R., Ferré, S., Giménez-Llort, L., Oven-Ögren, S. y Fuxe, K. (1998). Differential effects of selective adenosine A₁ and A_{2A} receptor agonists on dopamine receptor agonist- induce behavioural responses in rats. *European Journal of Pharmacology*. 347:153-158.
65. Robertson, G., S. y Robertson, H., A. (1986). Synergistic effects of D1 and D2 dopamine agonists on turning behaviour in rats. *Brain Research*. 384:387-390.
66. Schwarcz, R., Fuxe, K., Afnati, L. F., Hökfelt, T. y Coyle, J. T. (1979). Rotational behaviour in rats with unilateral striatal kainic acid lesions: a behavioural model for studies on intact dopamine receptors. *Brain Research*. 170:485-495.
67. Sosalla P. K, Manzino L. y Heikkila R. E. (1988). Interactions of D₁ and D₂ dopamine receptors an the ipsilateral vs. contralateral side in rats with unilateral lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 247(1): 180-5.
68. Svenningsson, P., Fourreau, L., Bloch, B., Fredholm, B. B., Gonon, F. y Le Moine, C. (1999). Opposite tonic modulation of dopamine and adenosine on c-fos gene expression in striatopallidal neurons. *Neuroscience*. 89(3):827-837.
69. Svenningsson, P., Le Moine, C., Fisone, G., y Fredholm, B. B. (1999). Distribution, biochemistry and function of striatal adenosine A_{2A} receptors. *Progress in Neurobiology*. 99:355-396.
70. Ungerstedt, U. y Arbuthnott W. G. (1970). Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine desions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Research*. 24:485-493.
71. Yung K. K. L., Smith, A. D., Levey, A. I. y Bolam J. P. (1996). Synaptic connections between spiny neurons of the direct and indirect pathways in the neostriatum of the rat: evidence from dopamine receptor and neuropeptide immunostaining. *European Journal of Neuroscience*. 8:861-869.

72. Yung, K. K. L., Bolam, J. P., Smith, A. D., Hersch, S. M., Ciliax, B. J., y Levey, A. I. (1995). Immunocytochemical localization of D1 and D2 dopamine receptors in the basal ganglia of the rat: light and electron microscopy. *Neuroscience*. 65(3):709-730.