



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

INTERACCIÓN MÚLTIPLE DE RECEPTORES PARA MODULAR LAS  
CORRIENTES DE CALCIO EN LAS NEURONAS ESTRIATALES

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Biol. Ernesto Alberto Rendón Ochoa

TUTOR PRINCIPAL

Dr. José Bargas Díaz

[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Juan Carlos Gómora Martínez – IFC. UNAM

Dr. José de Jesús García Valdés – FQ. UNAM

MÉXICO, D. F. Mayo de 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

# Contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1. LOS GÁNGLIOS BASALES.....	4
1.2. LA VÍAS DIRECTA E INDIRECTA.....	4
1.3. LA ENFERMEDAD DE PARKINSON: EL DESBALANCE DE LAS DOS VÍAS.....	7
1.4. LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS $A_{2A}$ , DOPAMINÉRGICOS $D_2$ Y CANNABINOIDES $CB_1$ .....	9
1.4.1. RECEPTORES DE ADENOSINA $A_{2A}$ .....	9
1.4.1.1. La adenosina como neurotransmisor.....	9
1.4.1.2. Los receptores $A_{2A}$ .....	10
1.4.2. RECEPTORES DE DOPAMINA $D_2$ .....	11
1.4.2.1. La dopamina como neurotransmisor.....	11
1.4.2.2. Los receptores $D_2$ .....	12
1.4.3. RECEPTORES A CANNABINOIDES $CB_1$ .....	12
1.4.3.1. Los cannabinoides.....	12
1.4.3.2. El receptor de cannabinoides $CB_1$ .....	13
1.4.4. INTERACCIONES BIOQUÍMICAS ENTRE LOS RECEPTORES $A_{2A}$ , $D_2$ Y $CB_1$ .....	13
1.4.4.1. Interacciones bioquímicas entre los receptores $A_{2A}$ y $D_2$ .....	13
1.4.4.2. Interacciones bioquímicas entre los receptores $A_{2A}$ y $CB_1$ .....	14
1.4.4.3. Interacciones fisiológicas entre los receptores $A_1$ y $A_{2A}$ .....	15
2. OBJETIVOS.....	16
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	16
2.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	16
3. HIPÓTESIS.....	16
4. MÉTODOS.....	16
4.1. Neuronas disociadas.....	16
4.2. Registros de fijación de voltaje en célula entera.....	17
4.3. Fármacos.....	17
4.4. Análisis estadístico.....	18
5. RESULTADOS.....	19
5.1. La activación secuencial de los receptores $D_2$ y $A_{2A}$ .....	19
5.2. La activación secuencial de los receptores $CB_1$ y $A_{2A}$ disminuye y aumenta las corrientes de $Ca^{2+}$ .....	22
6. DISCUSIÓN.....	25
7. CONCLUSIONES.....	26
8. RELEVANCIA.....	26
9. BIBLIOGRAFÍA.....	27



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. LOS GÁNGLIOS BASALES

Los ganglios basales (GB) son un grupo de núcleos subcorticales altamente interconectados. Son considerados como centros de regulación motora, aunque también están involucrados en funciones cognitivas, emocionales, selección de acciones y toma de decisiones. Forman una red compleja de asas que integran la información cortical, la talámica y la del tallo cerebral (Lévesque, *et al.*, 2003). Actúa como una interfase entre el sistema motor y el sistema límbico (Smith, *et al.*, 1998). Los núcleos de los GB considerados “motores” son: el neostriado o caudo-putamen (NSt), el globo pálido externo (GPe), el núcleo subtalámico (NST), el globo pálido interno (GPi), la sustancia nigra *pars reticulata* (SNr) y la sustancia nigra *pars compacta* (SNc) (Bolam *et al.*, 2000; Wichmann y DeLong, 2003).

El neostriado es el más grande y principal núcleo de entrada de los ganglios basales: procesa las entradas aferentes de la corteza y el tálamo (Berke, 2011).

## 1.2. LA VÍAS DIRECTA E INDIRECTA

La actividad estriatal se procesa través de distintos microcircuitos conformados por neuronas espinosas medianas (NEM) y distintos tipos de interneurona (Surmeier, *et al.*, 2011). El 95% del total de neuronas son NEM GABAérgicas: liberan el aminoácido ácido gamma-aminobutírico (Tepper, *et al.*, 2010). Estas neuronas procesan las entradas sinápticas y transmiten el resultado a los núcleos de salida usando, entre otras, dos vías principales: la directa y la indirecta (Gerfen, *et al.*, 1990, Smith, *et al.*, 1998; Fig. 1). Las neuronas de la vía directa expresan el receptor a dopamina  $D_1$  y junto con el GABA co-expresan y co-liberan sustancia P y dinorfina. Esta subpoblación neuronal proyecta sus axones directamente hacia los núcleos de salida: el GPi y la SNr. La subpoblación de la vía indirecta expresa el receptor a dopamina  $D_2$  y además del GABA, co-expresan y co-liberan encefalinas; proyectan al GPe. Como no proyectan directamente a los núcleos de salida, se les denomina neuronas que inician la “vía indirecta”, pues relevos sinápticos

adicionales son necesarios para llegar al GPi y a la SNr (Gerfen *et al.*, 1990). Después del GPe, el relevo más conocido es el núcleo subtalámico (NST), compuesto por neuronas excitadoras glutamatérgicas que, ellas sí, proyectan al GPi y a la SNr. Las mismas neuronas del GPe pueden proyectar al GPi y a la SNr. Hay conexiones recíprocas entre el GPe y el NST (Smith, *et al.*, 1998; Kravitz, *et al.*, 2010).

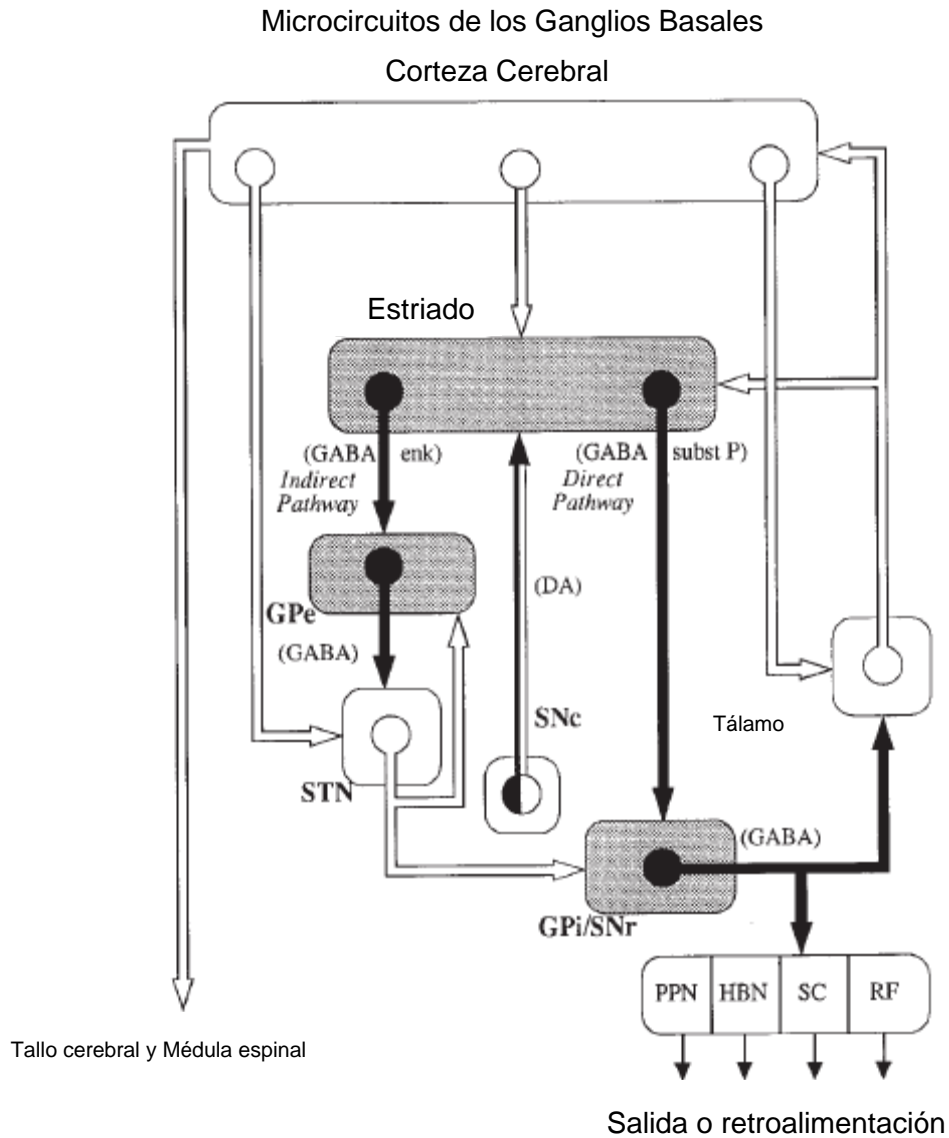


Fig. 1. Esquema de los ganglios basales. Las flechas negras indican proyecciones inhibitorias y las flechas blancas proyecciones excitatorias. (Gerfen, *et al.*, 1990, Smith, *et al.*, 1998).

La activación de estas dos vías tiene efectos opuestos y se considera que el balance dinámico entre las mismas produce el control motor normal. Por ejemplo, en condiciones de reposo la actividad de las NEM es baja comparada con las neuronas del GP y del NST. Cuando la corteza activa la vía directa la activación de las NEM inhibe a los núcleos de

salida (GPi/SNr) que disminuyen su disparo tónico. Esto provoca una desinhibición de los núcleos y vías que estos inervan: los circuitos tálamo-corticales que controlan los movimientos voluntarios o dirigidos a un objetivo y los circuitos del puente y el tallo cerebral que controlan el tono muscular y la actividad de los centros generadores de pautas. Esta vía, por tanto genera el movimiento.

Por otro lado, al ser activadas las neuronas de la vía indirecta, éstas inhibirán a las neuronas tónicas del GPe. Por lo tanto se desinhiben las neuronas del NST, y dado que estas neuronas son excitadoras, se provocará un incremento de la actividad de los núcleos de salida (GPi y SNr) inhibidores GABAérgicos. Esto aumenta la inhibición de los circuitos tálamo-corticales que controlan los movimientos voluntarios o dirigidos a un objetivo y los circuitos del puente y el tallo cerebral que controlan el tono muscular y la actividad de los centros generadores de pautas, lo que provoca el cese de los movimientos (Gerfen *et al.*, 1990; Smith, *et al.*, 1998; Kravitz, *et al.*, 2010; Herrero, *et al.*, 2002; DeLong y Wichmann, 2007; Takakusaki, *et al.*, 2004).

Hay dos clases de receptores a DA presentes en las NEM: la clase D<sub>1</sub> (receptores D<sub>1</sub> y D<sub>5</sub>), y la clase D<sub>2</sub> (receptores D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub>). Los sub-tipos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> están preferencialmente expresados en las vías “directa” e “indirecta”, respectivamente (Missale *et al.* 1998). Una pequeña población neuronal expresa ambos receptores (Surmeier, *et al.*, 2011). La dopamina incrementa la excitabilidad de las NEM de la vía directa (facilita los movimientos) a través de la activación de la adenilato ciclasa (AC) por un receptor acoplado a una proteína G del subtipo G<sub>s</sub>/olf. La activación de la AC incrementa la concentración de cAMP intracelular que a su vez estimula a la proteína cinasa A (PKA). Ésta última fosforila los canales de Ca<sup>2+</sup> de la subfamilia Ca<sub>v</sub>1 y aumenta la excitabilidad (Hernández-López *et al.*, 1997). Por otro lado, la activación de los receptores D<sub>2</sub> reprime la excitabilidad de la vía indirecta a través de la disminución de los niveles de cAMP intracelular. El receptor está acoplado negativamente a una proteína del subtipo G<sub>i/o</sub> (Missale, 1998). Además, activa la fosfolipasa C (PLC). Ésta inicia una cascada de señalización que culmina con la activación de la proteína fosfatasa 2B (PP-2B) que defosforila canales de Ca<sup>2+</sup> tipo Ca<sub>v</sub>1 y por lo tanto se reduce la excitabilidad neuronal (Nishi *et al.*, 1997, Hernández-López *et al.*, 2000).

### 1.3. LA ENFERMEDAD DE PARKINSON: EL DESBALANCE DE LAS DOS VÍAS

Entre los desordenes del movimiento se encuentran los Parkinsonismos, de los que, la enfermedad de Parkinson idiopática (PD) es el más común. Es un desorden neurodegenerativo caracterizado, en su fase final, por la pérdida de aferentes dopaminérgicas provenientes de la sustancia nigra *pars compacta* y del tegmento ventral, disminuyendo los niveles basales de DA al estriado. Clínicamente el PD se caracteriza por lentitud de los movimientos (bradicinesia), falta de movimientos (acinesia), rigidez muscular y temblor en reposo (Wichmann y Dostrovsky, 2011).

Los primeros estudios electrofisiológicos en primates encontraron una reducción en la actividad del GPe y un incremento en la actividad del STN y GPi (DeLong, 1990). Considerando estos resultados y basándonos en el modelo de las 2 vías, el GPe disminuye su actividad como consecuencia de un aumento en la actividad de la vía indirecta, no hay activación de los receptores D<sub>2</sub> y por lo tanto, no hay inhibición de la excitabilidad de estas neuronas. En contraste, la falta de activación del receptor D1 por ausencia de dopamina disminuye la actividad de la vía directa (Obeso, *et al.*, 2004) y aumenta la actividad del GPi y la SNr. Estos resultados han sido confirmados (Soares, *et al.* 2004) en primates lesionados sometidos a MTPT (1 Metil, 1,4 fenil, 1, 2, 3, 6 tetrahidropiridina). De igual manera, Ballion, *et al.* (2009) encontró que la activación de los receptores D<sub>2</sub> en las NEMs contrarresta la respuesta exacerbada de las neuronas de la vía indirecta. Adicionalmente, múltiples estudios han mostrado otros cambios tales como patrones sincronizados anormales, ráfagas de disparos y actividad oscilatoria en rangos de frecuencia beta o menor a lo largo de todos los GB (DeLong y Wichmann, 2007; Wichmann y Dostrovsky, 2011; Avila, *et al.*, 2010; Tachibana, *et al.*, 2011).

Debido a que la falta de DA en los GB es la causa principal de los cambios en la actividad de los circuitos estriatales, el tratamiento desde hace 50 años es la administración del precursor dopaminérgico L-DOPA, que es convertida a DA en ciertas terminales sinápticas (e.g., las serotoninérgicas). Sin embargo, por razones aún desconocidas, este tratamiento conlleva varios efectos secundarios ineludibles con el paso del tiempo: por ejemplo, la pérdida de intensidad (“wearing off” en inglés: disminución de las funciones motoras al final del intervalo de dosificación, justo antes de



la siguiente dosis), las discinesias (movimientos anormales e involuntarios) y las fluctuaciones “on – off” (periodos de funcionalismo normal en los que se presenta de manera aleatoria y brusca periodos de acinesia y aumento de temblores) (Lewitt, 2008), lo que incapacita al paciente a seguir una vida normal.

Debido a esto, es posible imaginar que no solo el sistema de neurotransmisión dopaminérgica se encuentra comprometido, sino que además de la DA otros sistemas de neurotransmisores se encuentran alterados. En este sentido, una línea de investigación ha sido la búsqueda de terapias coadyuvantes no dopaminérgicas de 2 formas: 1) terapias coadyuvantes que permitan el uso de L-DOPA y que prevengan, alivien o bien prolonguen la aparición de los efectos secundarios y 2) alternativas a las terapias de reemplazo de DA que no conlleven complicaciones a largo plazo (Brotchie, 2003). En este punto, se ha observado que la administración de antagonistas o agonistas de otros receptores tienen efecto benéfico en la enfermedad de Parkinson, tal es el caso del receptor de adenosina  $A_{2A}$  y el de los cannabinoides  $CB_1$ .

En el caso de la transmisión purinérgica (adenosina), varios estudios señalan que en modelos animales de PD así como en pruebas clínicas, mejora los déficits motores, prolonga el tiempo sin discinesias y reduce el temblor (de la mandíbula en roedores), además de producir efectos sinérgicos con la L-DOPA (Stacy, 2009; Lewitt, 2008; Shiozaki, *et al.*, 1999; Hauser, *et al.*, 2011; Black, *et al.*, 2010). Por otro lado, varios estudios muestran que la administración de nabilona (agonista canabinoide) tiene efectos antidiscinéticos (Fox, *et al.*, 2002; Sieradzan *et al.*, 2001; Ferrer, *et al.*, 2003; Morgese, *et al.*, 2007). También se ha reportado que los agonistas  $CB_1$  pueden prevenir la muerte de neuronas DAérgicas y sus aferentes al estriado (Chung, *et al.*, 2011). De esta forma, una línea de investigación farmacológica es encontrar interacciones entre transmisores para lograr fármacos coadyuvantes.

## 1.4. LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS A<sub>2A</sub>, DOPAMINÉRGICOS D<sub>2</sub> Y CANNABINOIDES CB<sub>1</sub>.

### 1.4.1. RECEPTORES DE ADENOSINA A<sub>2A</sub>

#### 1.4.1.1. La adenosina como neurotransmisor.

La adenosina es un nucleósido endógeno formado por la base purínica adenina y el azúcar ribosa. En el metabolismo celular actúa tanto como intermediario en rutas metabólicas como parte de cofactores en varias enzimas de oxidación-reducción o en reacciones de metilación en las que participa como donador de grupos metilo (Arch y Newsholme, 1978).

La adenosina se encuentra tanto en el lado intracelular como extracelular. La concentración en ambos compartimentos depende de enzimas que controlan su síntesis y degradación (Thorn y Javis, 1996). La síntesis intracelular de adenosina ocurre por dos vías: la desfosforilación de AMP por la 5'-nucleotidasa (5'NT) y la hidrólisis de S-adenosilhomocisteína (SAH) por la S-adenosilhomocisteína hidrolasa (SAHH). La concentración de adenosina está determinada por el estado energético de la célula. En condiciones basales la vía de la SAHH es la principal. La adenosina se libera de la célula utilizando el transportador de nucleósidos (Meghi, 1993).

En estados de gran demanda energética, la adenosina se forma rápidamente por desfosforilación consecutiva de los nucleósidos ATP, ADP y AMP (Meghi, 1993). En el medio extracelular este proceso depende de diversas ectonucleotidasas que degradan estos nucleótidos y los polifosfatos de diadenosina (A<sub>2</sub>PP<sub>1</sub>) provenientes del interior celular. Su degradación ocurre por deaminación a inosina mediante la acción de la enzima ecto-adenosina deaminasa (ecto-ADA) (Ciruela *et al.*, 1996). Así, las concentraciones extracelulares de adenosina cambian dependiendo del estado energético de la célula. En condiciones basales se tiene una concentración de 40 – 120 nM (Pinna, *et al.*, 2002) y en condiciones de alta actividad neuronal la concentración se eleva hasta alcanzar valores en el rango micromolar (> 2 μM; Meghi, 1993; Sciotti, *et al.*, 1993).

Los nucleósidos y nucleótidos purínicos así como la adenosina actúan como neuromoduladores intra y extracelularmente a través de receptores específicos de membrana. Estos receptores purinérgicos se clasifican en P<sub>1</sub> (adenosina) y P<sub>2</sub> (nucleótidos o ATP) (Fredholm, *et al.*, 1994)

### 1.4.1.2. Los receptores A<sub>2A</sub>.

La adenosina realiza sus funciones a través de la activación de diferentes receptores de membrana acoplados a proteínas G. Estos receptores se han clasificado en base a sus propiedades moleculares, bioquímicas y farmacológicas: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> y A<sub>3</sub>. Los receptores A<sub>1</sub> y A<sub>2A</sub> son de alta afinidad y son los que se encuentran en el SNC (Fredholm, *et al.*, 1994).

En análisis cristalográfico del receptor A<sub>2A</sub> muestra que el tercer “loop” o asa extracelular es el lugar donde ocurre la unión de antagonistas en conjunto con la segunda asa extracelular siendo las hélices VI y VII las responsables de la formación del pliegue de unión (Jaakola, *et al.*, 2008) (Fig. 2). La activación de la proteína G tiene lugar en la asa intracelular 3 en su parte N-terminal (Olah, 1997). El carboxilo terminal parece estar involucrado en la actividad constitutiva del canal al interactuar con la tercer asa intracelular (Klinger, *et al.*, 2002). Asimismo parece estar involucrado en la formación de heterómeros (Canals, *et al.*, 2003).

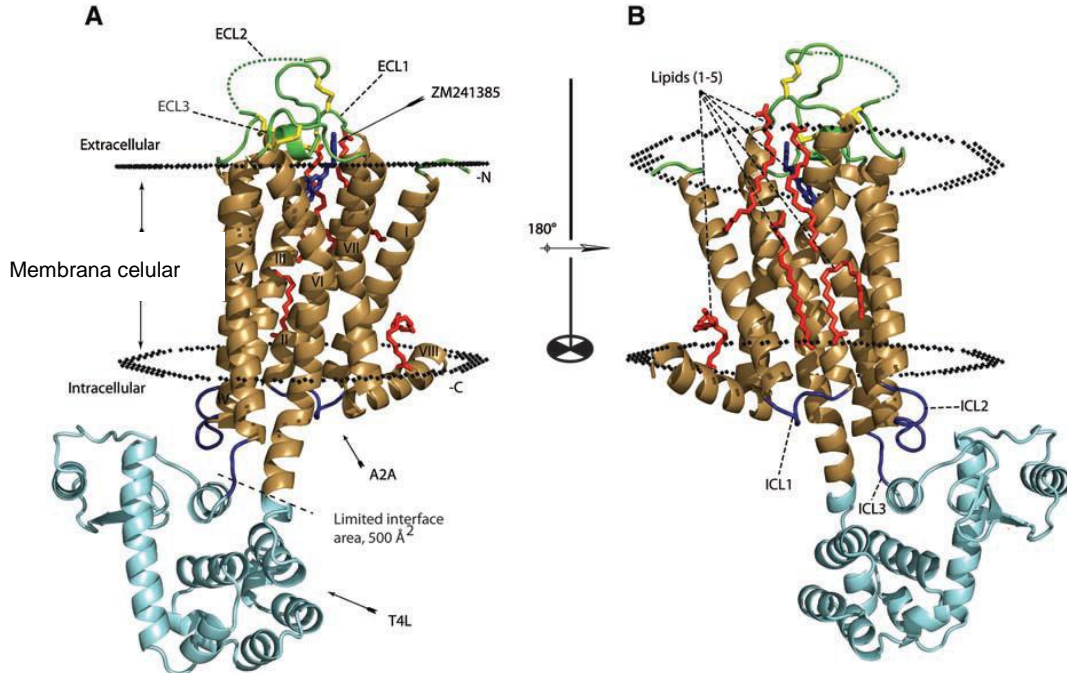


Fig. 2. Estructura cristalográfica del receptor A<sub>2A</sub> con la inserción de un motivo T4L (lisosima del bacteriófago T4) en el tercer loop intracelular. La cola del carboxilo terminal fue suprimida. Tomado de Jaakola, *et al.*, 2008.

Ya que la adenosina está asociada a muchas funciones es de esperarse que sus receptores estén acoplados a distintas proteínas G. De esta forma, el receptor a adenosina  $A_1$  está acoplado a una proteína del subtipo  $G_{i/o}$  y provoca la inhibición de la AC. En el laboratorio se ha encontrado que en las NEMs provoca una disminución en las corrientes de  $Ca^{2+}$  a través de canales  $Ca_v2.2$  (Hernandez-Gonzalez, tesis doctoral).

El receptor  $A_{2A}$  activa la AC a través de proteínas de tipo  $G_s/olf$  (Moreau, *et al*, 1999; Kull *et al*, 1999; 2000), provocando el aumento de los niveles de cAMP y la activación de la PKA, lo que a su vez regula el estado de fosforilación de varios sustratos como el elemento de unión en respuesta a cAMP o CREB por sus siglas en inglés (cAMP response element-binding) y de los canales de  $Ca^{2+}$  (Kull, *et al.*, 1999). En las neuronas de la vía indirecta la fosforilación de canales de  $Ca^{2+}$  de tipo  $Ca_v1$  debería aumentar la excitabilidad neuronal (Hernandez-Gonzalez, tesis doctoral). Además de la vía anteriormente descrita, también se ha reportado que este receptor puede activar una vía de señalización mediada por fosfolipasa C/ $InsP_3$ /calmodulina y calmodulina cinasa 2 (Wirkner, *et al.*, 2000).

En cuanto a la localización de los receptores  $A_{2A}$ , las técnicas de hibridación *in situ* y autoradiografía muestran una elevada cantidad de mRNA para el receptor  $A_{2A}$  en los GB, principalmente el estriado (Flink, *et al.*, 1992). De igual manera, con técnicas inmunohistoquímicas y de electrofisiología se reporta que el receptor  $A_{2A}$  está altamente expresado en neuronas estriatales de la vía indirecta (Ferré, *et al.*, 1993; 1997; Schiffmann, *et al.*, 2007; Tozzi, *et al.*, 2011).

## **1.4.2. RECEPTORES DE DOPAMINA $D_2$**

### **1.4.2.1. La dopamina como neurotransmisor.**

La DA es sintetizada a partir de la fenilalanina y la tirosina en el citosol de las terminales nerviosas dopaminérgicas. La liberación de la DA de la hendidura sináptica tienen lugar mediante la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje que promueve la fusión de vesículas con la membrana presináptica (Fuxe, 1979).

### 1.4.2.2. Los receptores D<sub>2</sub>

La primer clasificación de los receptores a DA en las familias D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> en 1979 se basó en la observación de que los receptores D<sub>1</sub> estaban positivamente acopladas a la AC, mientras los D<sub>2</sub> producían respuestas inhibitorias o no tenían efecto sobre la AC (Kebabian y Calne, 1979).

Este receptor se puede encontrar en 2 variantes por *splicing* alternativo: la isoforma D<sub>2</sub> “short” y el receptor D<sub>2</sub> “long” que contiene 444 aminoácidos en la cuarta asa intracelular. Los receptores D<sub>2</sub> tienen un extremo carboxilo terminal corto y una tercer asa intracelular larga, la cual parece estar implicada en el acoplamiento a la proteína G (Ilian, *et al.*, 2002). Ambas isoformas tienen la misma capacidad de unir ligando, pero difieren en la expresión. La isoforma larga se expresa unas 10 veces más que la corta (Missale *et al.*, 1998).

Los receptores a DA de tipo D<sub>2</sub> han atraído la atención principalmente por su influencia en enfermedades motoras como la enfermedad de Parkinson, asimismo, por su capacidad de interactuar con otros receptores.

## 1.4.3. RECEPTORES A CANNABINOIDES CB<sub>1</sub>

### 1.4.3.1. Los cannabinoides

Los endocannabinoides son derivados de fosfolípidos de membrana que actúan a través de la activación de receptores de membrana. En el sistema nervioso central ejercen efectos de depresión y analgesia. En 1990 se clonó el primer receptor de esta familia, el receptor CB<sub>1</sub>, y se eliminó la idea de que estos compuestos actuaban a través de cambios sobre las membranas. En cambio, actúan a través de receptores acoplados a proteínas G que inhibían la AC (Matsuda, *et al.*, 1990). En 1993 se clonó el otro receptor (CB<sub>2</sub>) (Murno, *et al.*, 1993) encontrándose principalmente en tejidos y células del sistema inmune (Pertwee, 1997), en glía y microglía (García-Arencibia, *et al.*, 2007).

Los endocannabinoides son sintetizados dependiendo de la demanda por células postsinápticas y funcionan como moléculas de señalización retrógrada: difundiendo desde la postsinápsis para unirse a receptores presinápticos CB<sub>1</sub> que modulan la liberación de neurotransmisores (Stella, *et al.*, 1997). Los dos principales son la anandamina (AEA) y el 2-araquidonoilglicerol (2-AG). La síntesis de AEA es a partir de ácido araquidónico y la fosfatidiletanolamina por las enzimas N-aciltransferasa y la fosfolipasa D. El 2-AG es más frecuentemente sintetizado a partir del fosfatidilinositol 4 – 5 bifosfato y diacilglicerol por la

enzima fosfolipasa C $\beta$  (Hermanson y Marnett, 2011). La degradación de la anandamina está dada por la enzima FAAH (Amina hidrolaza de ácidos grasos) que se encuentra anclada en la membrana con una localización postsináptica (Egertova, *et al.*, 2003), mientras que la MAGL (Monoacil glicerol lipasa) degrada 2-AG y se localiza en neuronas presinápticas (Dinh, *et al.*, 2002).

#### 1.4.3.2. El receptor de cannabinoides CB<sub>1</sub>

Este receptor es una proteína de siete dominios transmembranales muy abundante en el cerebro de los mamíferos (Hermanson y Marnett, 2011). La activación del receptor CB<sub>1</sub> tiene una variedad de efectos a través de todos los GB. En el estriado, este receptor está altamente expresados tanto postsináptica, como presinápticamente en las 2 poblaciones de NEMs (vías directa e indirecta), y en las interneuronas con excepción de las interneuronas colinérgicas (Hohmann y Herkenham, 2000). El receptor CB<sub>1</sub> presináptico reduce la liberación de glutamato al estriado a través de la liberación de anandamina desde la célula postsináptica. Es un mecanismo para la inducción de la depresión de largo plazo (LTD, *long termed depression*) (Gerdeman y Lovinger, 2001). A nivel postsináptico se ha encontrado que la estimulación del receptor CB<sub>1</sub> bloquea la activación de la AC y que este receptor y el dopaminérgico D<sub>2</sub> comparten la misma proteína G. Parece que la activación del receptor D<sub>2</sub> puede provocar la liberación de anandamina (Giuffrida *et al.*, 1999).

### **1.4.4. INTERACCIONES BIOQUÍMICAS ENTRE LOS RECEPTORES A<sub>2A</sub>, D<sub>2</sub> Y CB<sub>1</sub>.**

#### 1.4.4.1. Interacciones bioquímicas entre los receptores A<sub>2A</sub> y D<sub>2</sub>.

El receptor D<sub>2</sub> se encuentra en las neuronas de la vía indirecta, su activación conlleva a una disminución del movimiento (Gerfen *et al.*, 1990; Smith, *et al.*, 1998; Kravitz, *et al.*, 2010; Herrero, *et al.*, 2002; DeLong y Wichmann, 2007). Por su parte, la administración de agonistas A<sub>2A</sub> provoca catalepsia, aliviada por la posterior administración de agonistas D<sub>2</sub> (Ferré, *et al.*, 1991). Con el objetivo de saber si estos 2 receptores interaccionan, se realizaron varios experimentos de afinidad: la afinidad del receptor D<sub>2</sub> por la DA disminuye

cuando se activa el receptor  $A_{2A}$  (Ferre, *et al.*, 1991; Kull, *et al.*, 1999, Díaz-Cabiale, *et al.*, 2001). Asimismo, Hillion *et al.* (2002) con ensayos de coimmunoprecipitación en células transfectadas con ambos receptores mostró una coagregación.

Ensayos de transferencia de energía bioluminiscente resonante (BRET, *Bioluminescence Resonance Energy Transfer*) así como pruebas de transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET, *Fluorescence Resonance Energy Transfer*) mostraron en células que coexpresan ambos receptores una cercanía de menos de 10 Å (Canals, *et al.*, 2003; Canals *et al.*, 2004).

Pruebas electrofisiológicas sobre la interacción de estos receptores han mostrado que la activación del receptor  $A_{2A}$  no tiene efecto sobre el disparo de potenciales de acción inducido por la aplicación de N-Metil-D-Aspartato (NMDA). Pero si estos disparos son suprimidos por la activación del receptor  $D_2$ , la subsiguiente activación del receptor  $A_{2A}$  los recupera. Esto es, el receptor  $D_2$  habilita al receptor  $A_{2A}$ . Este mecanismo puede ser dependiente de la heteromerización de los receptores, ya que al dializar las células con péptidos que separan los heterómeros, la interacción se pierde (Azdad, *et al.*, 2009). Asimismo, la disminución de la corriente de  $Ca^{2+}$  inducida por el receptor NMDA provocado por el receptor  $D_2$  es prevenida si se presenta la activación del receptor  $A_{2A}$ . Ambos receptores actúan a nivel de PKA en la regulación de esta respuesta (Tozzi, *et al.*, 2007; Higley y Sabatini, 2010).

#### 1.4.4.2. Interacciones bioquímicas entre los receptores $A_{2A}$ y $CB_1$ .

Hasta la fecha, poco se ha publicado sobre si existe o no interacción funcional entre los receptores  $A_{2A}$  y  $CB_1$ . Carriba *et al.* (2007) mostró que ambos receptores forman estructuras relacionadas ya que en ensayos de inmunohistoquímica y coimmunoprecipitación sobre membranas estriatales se encontraron íntimamente relacionados. Los análisis de BRET colocan a estos receptores en una íntima cercanía. Los experimentos de acumulación de cAMP en células que expresan ambos receptores revelan que la activación del receptor  $A_{2A}$  contrarresta la disminución de la cantidad de cAMP provocada por el receptor  $CB_1$ . Cuando se incubaron las células con la enzima adenosin-deaminasa (ADA), que elimina la concentración basal de adenosina, la disminución por parte de los agonistas  $CB_1$  era nula. Esto indica que es necesaria la activación de los receptores  $A_{2A}$  para observar la respuesta de receptor  $CB_1$ . Otro estudio

ha encontrado resultados similares con el uso de potenciales extracelulares de campo en rebanadas corticoestriatales: la capacidad de agonistas CB<sub>1</sub> en deprimir la transmisión sináptica fue prevenida por el bloqueo farmacológico del receptor A<sub>2A</sub> (Martire, *et al.*, 2011). Se obtuvieron resultados similares con el uso de ratones knockout (KO) para este receptor (Tebano, *et al.*, 2009).

#### 1.4.4.3. Interacciones fisiológicas entre los receptores A<sub>1</sub> y A<sub>2A</sub>

En nuestro laboratorio se ha encontrado la primera interacción fisiológica entre los receptores A<sub>1</sub> y A<sub>2A</sub>, (Hernández-Gonzalez, tesis doctoral). Se encontró que el receptor A<sub>2A</sub> solo puede ejercer sus efectos cuando está previamente ocupado el receptor A<sub>1</sub>. A concentraciones nanomolares de adenosina se ocupa el receptor A<sub>1</sub>, y sólo a concentraciones más elevadas (micromolares) lo hace el receptor A<sub>2A</sub>. El receptor A<sub>2A</sub> aumenta la excitabilidad de las NEM a través del aumento de la corriente de calcio por los canales Ca<sub>v</sub>1. Mientras que el receptor A<sub>1</sub> disminuye la entrada de calcio a través de los canales Ca<sub>v</sub>2.2. Estos resultados proporcionan una visión de la manera en la que podrían encontrarse los circuitos estriatales en la enfermedad de Parkinson. Como sabemos, la falta de DA hace que los receptores D1 y D2 no pueden activarse. Entonces, la vía directa no se activa y la vía indirecta está hiperactiva (Obeso, 2004; Soares, *et al.*, 2004; Ballion, *et al.*, 2009; Kravitz, *et al.*, 2010; Morelli, *et al.*, 2007; Kreitzer y Malenka, 2008). La vía indirecta sobreactivada aumenta las concentraciones de adenosina (Noji, *et al.*, 2004; Ciruela *et al.*, 1996; Pinna, *et al.*, 2002; Meghi, 1993; Sciotti, *et al.*, 1993). La elevada concentración de adenosina activará a los receptores A<sub>2A</sub> aumentando aún más la corriente acarreada por el canal Ca<sub>v</sub>1. El canal Ca<sub>v</sub>2.2, por otro lado, estaría inhibido. Esto produce un efecto sinérgico, pues el aumento en la actividad de los canales Ca<sub>v</sub>1 aumenta la excitabilidad y la reducción de los canales Ca<sub>v</sub>2.2 aumenta la excitabilidad al reducir las corrientes dependientes de K<sup>+</sup> responsables del post potencial hiperpolarizante y el intervalo interespigas (Pérez-Garci, *et al.*, 2003). La acción sobre ambos canales provocará una actividad exacerbada. Los signos Parkinsonianos por la ausencia de la activación del receptor D<sub>2</sub> se verán amplificados (Azdad, *et al.*, 2009). Esto explica porque el uso de antagonistas A<sub>2A</sub> puede ser una estrategia para intentar romper este ciclo.

El punto de esta tesis es que si pudiésemos encontrar más interacciones entre otros receptores y los dopaminérgicos, acaso podríamos alargar el tiempo útil de la L-DOPA.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar si existen otras interacciones del receptor  $A_{2A}$  con los otros receptores presentes en las neuronas de la vía indirecta de manera que se puedan sugerir nuevos fármacos coadyuvantes para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson

### 2.2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar si existe una interacción  $A_{2A}/D_2$  sobre las corrientes de  $Ca^{2+}$
2. Determinar si existe una interacción  $A_{2A}/CB_1$  sobre las corrientes de  $Ca^{2+}$
3. Determinar el (los) tipo (s) de canal de calcio involucrado (s) en estas interacciones

## 3. HIPÓTESIS

Si existe una interacción entre los receptores  $A_{2A}/D_2$  y  $A_{2A}/CB_1$  entonces habrá una modulación secuencial de las corrientes de calcio.

## 4. MÉTODOS

### 4.1. Neuronas disociadas

Usamos neuronas disociadas del estriado dorsal obtenidas de ratas macho Wistar de 100 – 120 g. El cerebro se extrae después de sacrificar al animal por decapitación, previa anestesia. Con ayuda de un vibratomo se obtienen rebanadas de 300  $\mu$ m de espesor, que son mantenidas durante 1-6 h en solución salina a 34°C. La solución salina contiene (en mM): 126 NaCl, 3 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 0.2 tiourea, 0.2 ácido ascórbico y 10 glucosa (pH 7.4). Luego, las neuronas son sometidas a un proceso de disociación utilizando enzimas proteolíticas: 1 mg/ml pronasa tipo E XIV (Sigma), durante 15 min, a 34°C en una solución de bajo  $Ca^{2+}$ . Después del periodo de digestión, se realiza una disociación mecánica con pipetas Pasteur de diferente calibre para la obtención de neuronas individuales en solución salina baja en  $Ca^{2+}$  (0.4 mM). La suspensión celular (2 ml) es colocada en cajas de Petri montadas en un microscopio invertido. La caja de Petri contiene 1 ml de solución salina de registro (en mM): 0.001 tetrodotoxina (TTX), 130 NaCl,

3 KCl, 5 BaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES y 10 glucosa (pH=7.4 con NaOH; 298 ± 5 mOsm/l con la glucosa).

## 4.2. Registros de fijación de voltaje en célula entera

Se utilizó la técnica de fijación de voltaje en célula completa en neuronas disociadas de 10 – 12 µm de diámetro y una capacitancia de 6 – 7 pF (Yan y Surmeier, 1996). Para el registro se estiraron pipetas de borosilicato (WPI, Sarasota, FL) en un estirador Flaming–Brown (Sutter Instrument Corp. Novato, CA). La solución interna contiene (en mM): 140 N-metil-D-glucamina, 40 HEPES, 10 EGTA, 4 MgCl<sub>2</sub>, 2 ATP, 0.4 GTP y 0.1 leupeptina (pH=7.2 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 280 ± 5 mOsm).

Los registros emplearon electrodos con una corriente directa de 3 – 6 MΩ en el baño. Los registros se obtuvieron con un amplificador Axopatch 200B (Axon instruments, Foster city, CA, EUA) y controlados y monitoreados con pClamp (versión 8.2). La resistencia en serie (<15 MΩ) fue compensada (70 – 80%) y monitoreada a lo largo del experimento.

Se utilizó Ba<sup>2+</sup> como acarreador de carga. El Ba<sup>2+</sup> también es un potente bloqueador de canales de potasio. Los canales de sodio fueron bloqueados con 1 µM de tetrodotoxina (TTX). Además, el potasio intracelular fue sustituido por 180 mM de N-metil-D-glutamina (NMDG). Las relaciones corriente-voltaje (curvas I-V) antes y durante la aplicación de los fármacos se generaron con la amplitud máxima de las corrientes en respuesta a comandos de voltaje en forma de pasos de 10 mV desde un potencial de mantenimiento de -80 mV hasta llegar a +50 mV o más. También se usaron comandos de voltaje en forma de rampa (0.7 mV/ms) desde -80 hasta +50 mV. Cuando ambos métodos coinciden consideramos que la fijación espacial del voltaje es aceptable. Por claridad, las figuras muestran únicamente las respuestas a las rampas de voltaje. Como los efectos son transitorios, se prefiere evaluar el curso temporal de estos efectos a partir de los valores de corriente máxima en respuesta a la rampa de voltaje.

## 4.3. Fármacos

Los fármacos se aplican con un sistema de perfusión que funciona con gravedad a través de un capilar posicionado aproximadamente a 100-200 µm de la célula a registrar. Los cambios de solución se realizan a una velocidad de 0.5 ml/min usando un sistema de microválvulas controlado por voltaje (Lee; Essex, CT, EUA).

Los fármacos usados fueron: tetrodotoxina (TTX; Alomone Labs; Jerusalem, Israel); nicardipina, quinelorane (Sigma – Aldrich – RBI, St Louis, MO), CGS 21680, WIN 55,212-2 y SCH 58261 (Tocris Cookson, Ellisville, MO). Las sustancias se disolvieron en agua para obtener disoluciones madre que añadidas a 10 ml de solución externa resultaban en la concentración deseada. La solución concentrada para CGS 21680 y WIN 55,212-2 se prepararon con dimetilsulfóxido (DMSO 0.1%). La nicardipina se preparó en HCl (1%); la disolución control en ambos casos contenía DMSO y HCl, respectivamente.

#### **4.4. Análisis estadístico**

Se reportan medianas y los percentiles 25-75 de los valores de corriente. Se utilizaron los valores de corriente absoluta para encontrar diferencias significativas. Para el análisis estadístico se utilizó una prueba de Friedman (libre de distribución) y una prueba *post hoc* de Dunn para comparar pares de muestras. Cuando sólo había un cambio se utilizó la prueba T de Wilcoxon. La significancia estadística fue considerada como  $P < 0.05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. La activación secuencial de los receptores D<sub>2</sub> y A<sub>2A</sub>

Se observaron 2 efectos distintos al aplicar quinolorane (agonista D<sub>2</sub>) antes de CGS 21680 (agonista A<sub>2A</sub>). El 59% de las neuronas registradas (10/17) no mostró ningún cambio en las corrientes de Ca<sup>2+</sup>. Estas neuronas corresponderían a neuronas de la vía directa que no expresan estos receptores (Fig. 3).

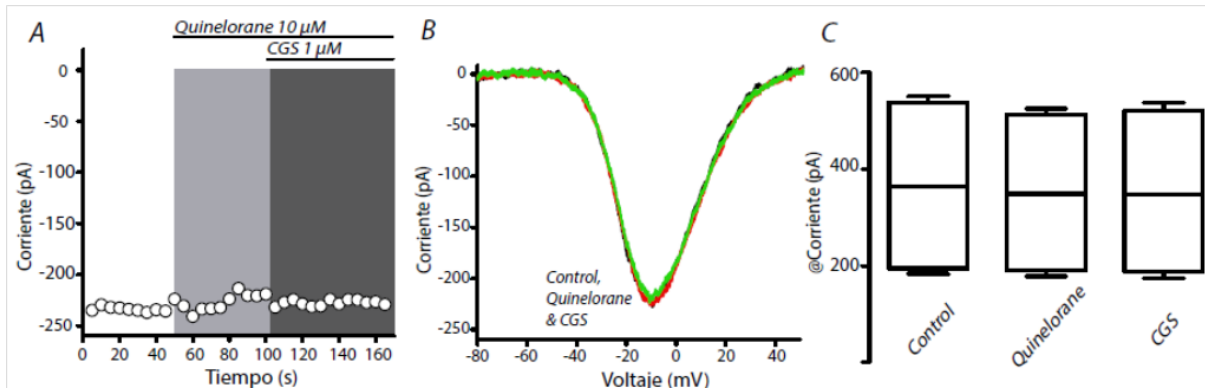


Fig. 3. Efecto de 10  $\mu\text{M}$  quinolorane en las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  en neuronas estriatales de proyección de la vía directa. A) Curso temporal de la amplitud de corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  ante la aplicación secuencial de 10  $\mu\text{M}$  de quinolorane y 1  $\mu\text{M}$  de CGS 21680, obsérvese que no hay efecto alguno de los agonistas. B) curva I-V representativa. C) Gráfica de cajas de los 3 fármacos (n=10). No hubo diferencias significativas. Las medianas y percentiles del control, quinolorane y CGS: 268 (204,451), 247 (192, 421) y 244 (187, 419) pA, respectivamente.

Pero en el 41% de las células (7/17) se encontró que la administración de quinolorane reduce las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  un  $34 \pm 8\%$  (Fig. 4). Estas neuronas corresponden a las neuronas estriatales de proyección de la vía indirecta (D<sub>2</sub>) (Missale *et al.* 1998; Hernández-López *et al.*, 1997; 2000; Nishi *et al.*, 1997).

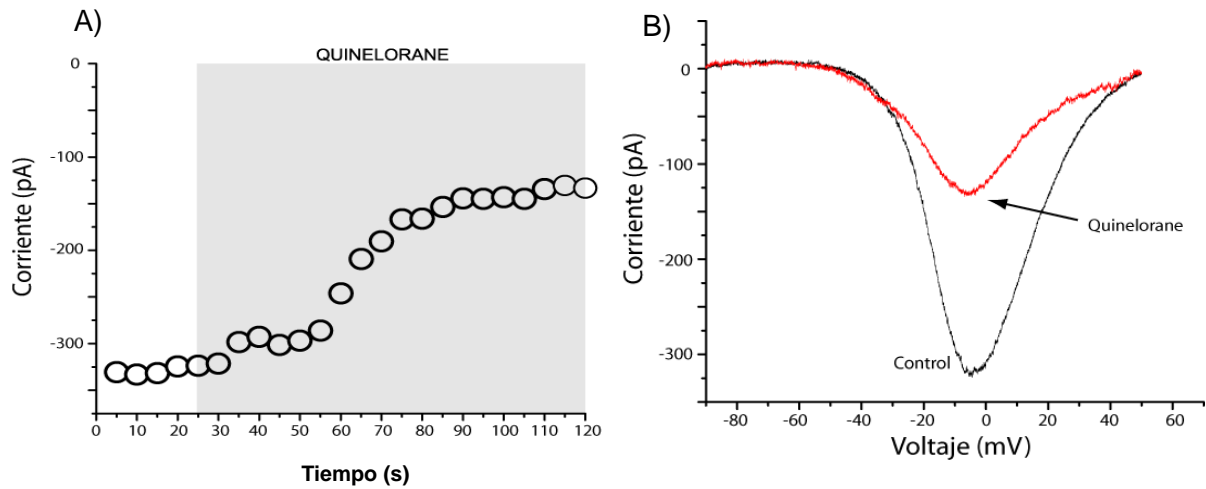


Fig. 4. Efecto de 10  $\mu\text{M}$  quinlorane en las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  en neuronas estriatales del proyección de la vía indirecta. A) Curso temporal de la amplitud de corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  después de la aplicación de quinlorane. La disminución de las corrientes provocada por el quinlorane fue del 34%. B) Curvas I-V representativas de la misma célula que en A. Medianas y percentiles del control y quinlorane: 297 (233, 307) y 199 (126, 234) pA.

Después probamos si el agonista  $A_{2A}$ , el CGS, era capaz de revertir la disminución de la corriente provocada por el agonista  $D_2$  (Fig.5).

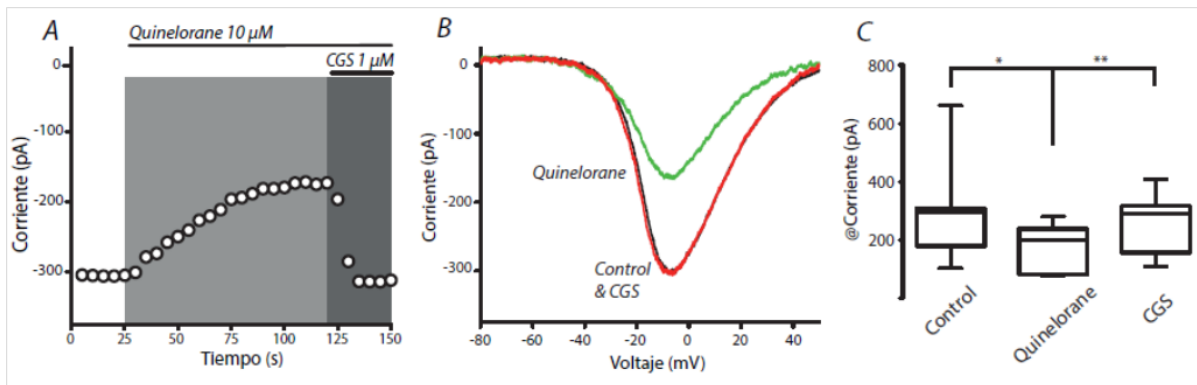


Fig. 5. Efecto secuencial de 10  $\mu\text{M}$  quinlorane y 1  $\mu\text{M}$  CGS 21680 sobre las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  en neuronas estriatales de proyección de la vía indirecta. A) Curso temporal de la amplitud de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  después de aplicar quinlorane y luego CGS 21680. El CGS 21680 revertir la acción del quinlorane. B) curvas I-V representativas de la misma neurona. C) Gráfica de Tukey mostrando diferencias significativas (\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.001$ ). Medianas y percentiles del control, quinlorane y CGS: 297 (233, 307), 199 (126, 234) y 290 (199, 312) pA, respectivamente.

Como puede observarse el quinlorane disminuye y la subsecuente aplicación de CGS 21680 aumenta la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  revirtiendo la acción del quinlorane (\*  $p<0.05$ ,

\*\* p<0.01, n = 7). El aumento provocado por el CGS 21680 con respecto a la disminución del quinelorane fue de  $27 \pm 5 \%$ .

Para saber si el aumento en la corriente por el efecto del CGS 21680 era específico, realizamos experimentos en presencia de SCH 58261, un antagonista selectivo de los receptores  $A_{2A}$ . En las neuronas que respondían al quinelorane (vía indirecta, 58% del total de neuronas de esta muestra: 8/14), el SCH 58261 no bloqueó el efecto del quinelorane pero bloqueó las acciones del receptor  $A_{2A}$  (Fig. 6).

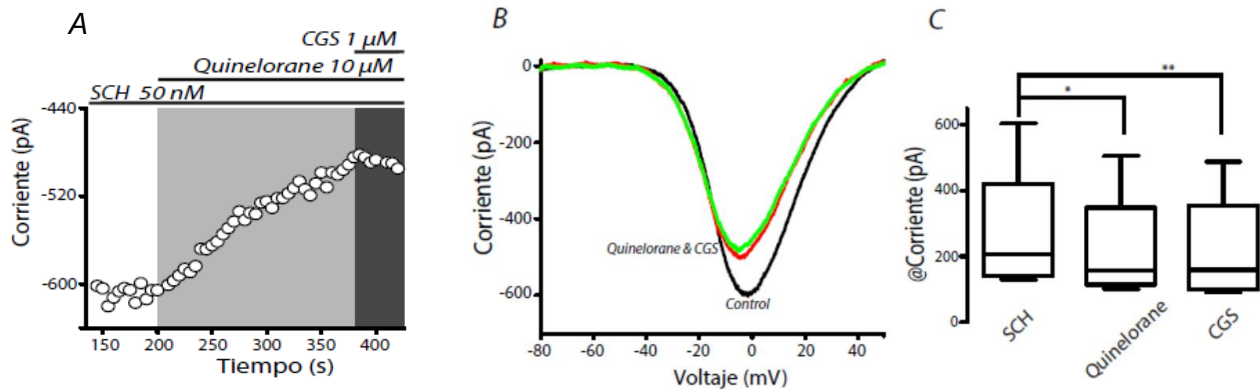


Fig. 6. Efecto de 10  $\mu\text{M}$  de Quinelorane y 1  $\mu\text{M}$  de CGS 21680 sobre las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  en neuronas estriatales de proyección de la vía indirecta en presencia de 50 nM del antagonista  $A_{2A}$  SCH 58261. A) Curso temporal de la amplitud de corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  de la aplicación secuencial de 10  $\mu\text{M}$  de quinelorane y 1  $\mu\text{M}$  de CGS 21680 después de la aplicación del antagonista SCH 58261. Obsérvese que el CGS 21680 no provoca aumento de las corrientes. B) Curva I-V representativa de la misma neurona del curso temporal. C) Gráfica de cajas mostrando diferencias significativas entre los fármacos \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ . Medianas y percentiles correspondientes: SCH: 207 (158, 376), quinelorane: 158 (128, 307) y CGS: 158 (116, 295).

Se sabe que los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo  $\text{Ca}_v1$  son los que son modulados por el receptor  $D_2$ , asimismo Hernandez-Gonzales (*tesis doctoral*) reporta que el receptor  $A_{2A}$  aumenta la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de estos canales. Para averiguar si los canales  $\text{Ca}_v1$  eran los que se modulaban en nuestro experimento, decidimos aplicar 5  $\mu\text{M}$  de nicardipina una vez observado el aumento de la corriente provocada por el CGS 21680 (Fig. 7).

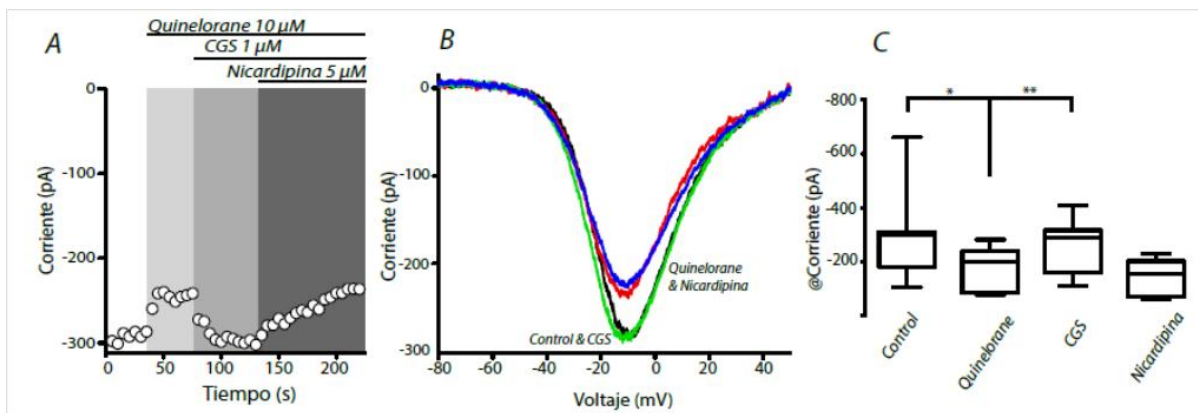


Fig. 7. Las dihidropiridinas bloquean la acción del receptor  $A_{2A}$ . A) Curso temporal de la amplitud de corrientes de  $Ca^{2+}$  de la aplicación secuencial de  $10 \mu M$  de quinelorane  $1 \mu M$  de CGS 21680 y  $5 \mu M$  de nicardipina mostrando que la modulación del CGS 21680 sobre la disminución provocada por el Quinelorane es modulada por canales de  $Ca^{2+}$  tipo  $Ca_v1$ . B) curva I-V representativa de la misma neurona del curso temporal. C) Gráfica de cajas mostrando diferencias significativas entre los fármacos \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ .

La aplicación de la nicardipina provocó una disminución del  $47 \pm 7 \%$  ( $n=5$ ) con respecto al control. Estos resultados apuntan a que de igual manera, el CGS 21680 está actuando sobre los canales de  $Ca^{2+}$  tipo  $Ca_v1$ . Es interesante observar que la disminución debida o inducida por el quinelorane fue de un  $34\% \pm 8$ , el aumento del CGS 21680 fue de un  $27\% \pm 5$  y la disminución provocada por nicardipina fue de  $47\% \pm 7$  (Mediana: 154 (81, 176)). Estos resultados diferentes nos hacen pensar que la modulación no es uniforme sobre toda la población de canales  $Ca_v1$ .

Dados los resultados anteriores, concluimos que si hay interacciones fisiológicas entre estos receptores.

## 5.2. La activación secuencial de los receptores $CB_1$ y $A_{2A}$ disminuye y aumenta las corrientes de $Ca^{2+}$ .

Al igual que con el receptor a dopamina  $D_2$ , se ha reportado que el receptor  $CB_1$  puede interactuar con el receptor  $A_{2A}$  y que incluso se ha sugerido que el efecto de los cannabinoides es únicamente observado si el receptor de adenosina  $A_{2A}$  está ocupado (Carriba *et al.*, 2007; Tebano, *et al.*, 2009; Martire, *et al.*, 2011; Ferré, *et al.*, 2010). Esto nos llevó a preguntarnos si la interacción que observamos con el receptor de adenosina  $A_1$  y de dopamina  $D_2$  sobre el receptor  $A_{2A}$  era similar a la que se podría dar con el receptor  $CB_1$ .

En 8 neuronas estudiadas la aplicación de WIN 55212 provocó una disminución en las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  de  $21.45 \pm 3 \%$  (Fig. 8).

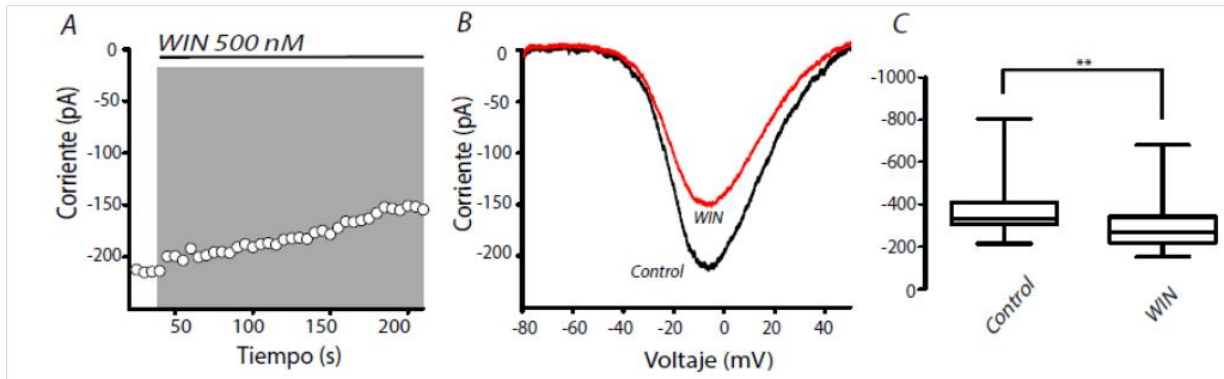


Fig. 8. Efecto de 500 nM de WIN 55212 en las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  en neuronas estriatales de proyección. A) Curso temporal de la amplitud de corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  de la aplicación secuencial de 500 nM de WIN 55212. La disminución de las corrientes provocada por el WIN 55212 fue  $21.45\% \pm 3$  con respecto al control. B) Curva I-V representativa de la misma neurona del curso temporal. C) Gráfica de cajas mostrando diferencias significativas entre el control y el WIN 55212. \*\*  $p < 0.01$ . Mediana y percentiles del control: 332 (313, 405) y WIN: 266 (224, 339) pA.

El análisis de Wilcoxon muestra diferencias significativas con la aplicación de WIN 55212 (\*\* $p < 0.01$ ). Para determinar los efectos del receptor  $\text{CB}_1$  sobre el receptor  $\text{A}_{2\text{A}}$  aplicamos CGS 21680 a las neuronas después del efecto de disminución del WIN 55212. En el 50% de las neuronas registradas ( $n=4$ ) se observó que el CGS 21680 no tuvo algún efecto sobre las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estas neuronas presumiblemente pertenecen a NEMs de la vía directa (Fig. 9).

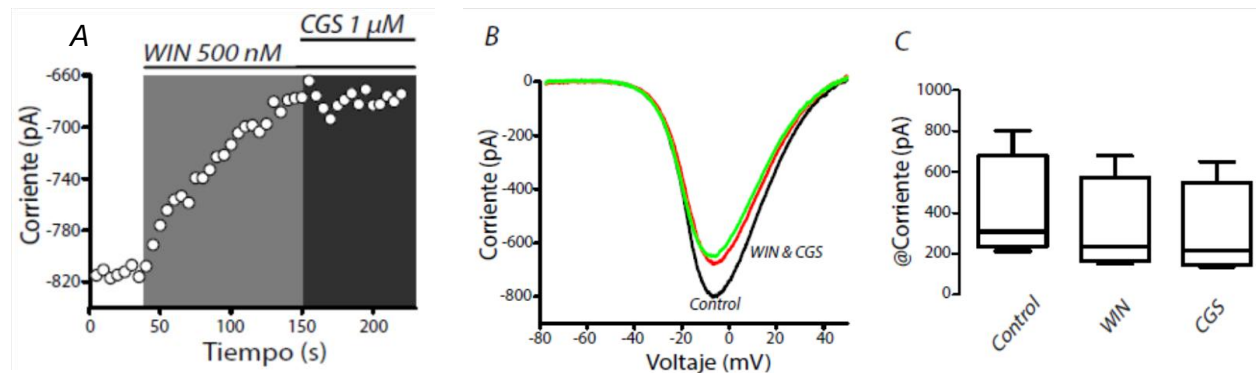


Fig. 9. Efecto de 500 nM de WIN 55212 y la subsecuente aplicación de  $1 \mu\text{M}$  de CGS 21680 en las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  en neuronas estriatales de proyección presumiblemente de la vía directa. A) Curso temporal de la amplitud de corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  de la aplicación secuencial de 500 nM de WIN 55212 y  $1 \mu\text{M}$  de CGS 21680. Nótese que el CGS 21680 no provocó diferencia alguna en la amplitud de las corrientes. B) Curva I-V representativa de la misma neurona del curso temporal. C) Gráfica de cajas de 4 neuronas registradas. Medianas y percentiles del control: 309 (279, 439), WIN: 235 (200, 361) y CGS: 216 (172, 348) pA.



En el otro 50% de las neuronas (n=4), las de la vía indirecta, la administración de CGS 21680 aumentó en un  $19 \pm 1.32 \%$  la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$ , mostrando de esta manera que el efecto de un receptor ( $A_{2A}$ ) puede ser modificado por el del otro receptor ( $\text{CB}_1$ ) (interacción) (Fig. 10).

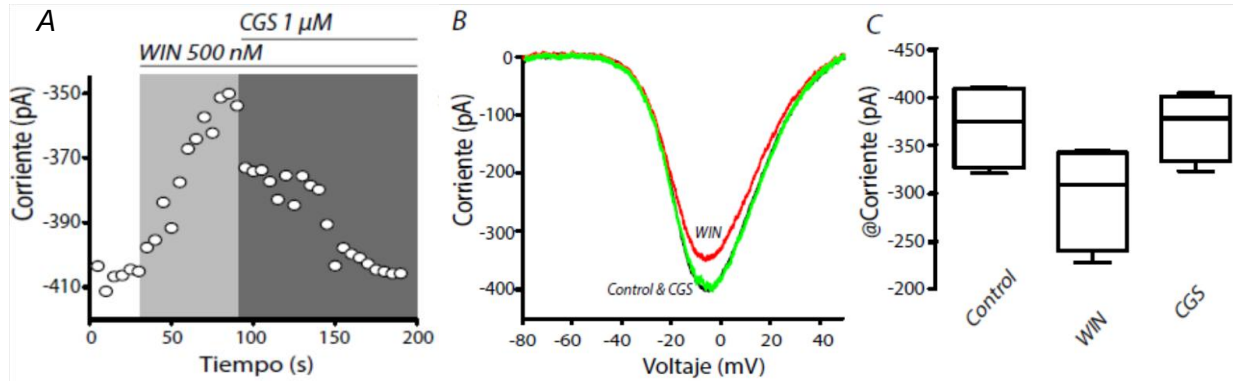


Fig. 10. Interacción funcional  $\text{CB}_1/\text{A}_{2A}$ . Acción de 500 nM de WIN 55212 (disminución de la corriente) y la modificación de este efecto (restauración de la corriente) debido a la subsecuente aplicación de 1  $\mu\text{M}$  de CGS 21680 en las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  en neuronas estriatales de proyección, presumiblemente de la vía indirecta. A) Curso temporal de la amplitud de corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a la aplicación secuencial de 500 nM de WIN 55212 y 1  $\mu\text{M}$  de CGS 21680. Véase que el CGS 21680 provocó un aumento en la amplitud de las corrientes de un  $18.72 \pm 1.32 \%$  con respecto a la disminución provocada por el WIN 55212. B) Curvas I-V representativas de la misma neurona mostrada en A. Curso temporal C) Gráfica de línea pareada de 4 neuronas registradas donde se observa el aumento en la amplitud de las corrientes. Mediana y percentiles del control: 374 (338, 405), WIN: 307 (265, 339) y CGS: 377 (355, 392).

## 6. DISCUSIÓN

¿Por qué el tratamiento substitutivo con L-DOPA no es suficiente para aliviar la PD de manera permanente?

La reposición de DA a través de L-DOPA intenta restaurar la actividad de la vía directa e indirecta. Nuestros resultados muestran que eso no es suficiente, ya que la disminución en la excitabilidad provocada por el receptor de dopamina  $D_2$  es contrarrestada, en cierta medida, por la activación del receptor  $A_{2A}$ . Ya que encontramos que la acción del receptor  $D_2$  sobre los canales  $Ca_v1$  es revertida por la activación del receptor  $A_{2A}$ . Concluimos que la sola administración de L-DOPA no será suficiente para regresar a las neuronas a su actividad basal de manera permanente, será pues necesaria la administración de la terapia coadyuvante: los antagonistas del receptor  $A_{2A}$ .

El aumento en las corrientes de  $Ca^{2+}$  provocado por el receptor  $A_{2A}$  sólo se observa cuando se activa previamente el receptor  $D_2$  o el receptor  $CB_1$ . En el caso del receptor  $D_2$ , los experimentos de reducción de afinidades provocados por el agonista  $A_{2A}$  (Ferre, *et al.*, 1991; Kull, *et al.*, 1999, Díaz-Cabiale, *et al.*, 2001), así como los experimentos de BRET y FRET (Canals, *et al.*, 2003; Canals *et al.*, 2004) y la coimmunoprecipitación (Hillion *et al.* 2002), ponen de manifiesto una interacción a nivel de membrana de estos receptores. Azdad *et al.* (2009) reporta resultados similares a los nuestros, indicando que es necesaria la activación del receptor  $D_2$  a fin de observar los efectos del receptor  $A_{2A}$  y que este efecto depende de la formación de heterómeros entre estos receptores. Sin embargo, con nuestros resultados no podemos afirmar que el efecto observado sea por la formación de heterómeros, ya que también se ha observado que estos receptores activan cascadas de segundos mensajeros que podrían converger en un punto determinado. Por ejemplo, la activación del receptor  $D_2$  puede inhibir la activación de la cascada cAMP-PKA provocada por el receptor  $A_{2A}$  (Kull, *et al.*, 1999; Hillion *et al.*, 2002). Estudios futuros deberán dilucidar a qué nivel y cuántos tipos de interacción son posibles usando péptidos que disocien ésta probable asociación a nivel de membrana. Por otro lado también es necesario el uso de bloqueadores y/o activadores de las vías de señalización, para poder dilucidar los niveles de interacción entre estos receptores.

En el caso del receptor  $CB_1$ , hay estudios que muestran una relación con el receptor  $A_{2A}$  casi idéntica a la que se tiene con el receptor  $D_2$ , ya que se han encontrado que están íntimamente relacionados a nivel de membrana con ensayos de BRET, FRET,

coimmunoprecipitación e inmunocitoquímica (Carriba, *et al.*, 2007). También se ha encontrado que estos receptores actúan a nivel de segundos mensajeros ya que la disminución de la cantidad de cAMP provocada por el receptor CB<sub>1</sub> es contrarrestada por la activación del receptor A<sub>2A</sub> (Carriba, *et al.*, 2007). En nuestros resultados encontramos que la disminución de la corriente de Ca<sup>2+</sup> provocada por la activación del receptor CB<sub>1</sub> es revertida por la activación del receptor A<sub>2A</sub>. Esto muestra porque la activación de receptores CB<sub>1</sub> ha demostrado tener efectos anti-disicinéuticos (Fox, *et al.*, 2002; Sieradzan *et al.*, 2001; Ferrer, *et al.*, 2003; Morgese, *et al.*, 2007). Nuestros resultados ponen de manifiesto nuevamente la posible interacción a través de las proteínas efectoras, los canales de calcio. De nuevo, una rica línea de investigación para estudiar a qué nivel surgen las interacciones es potencialmente probable.

Ya que nuestros objetivos se enfocan en el uso potencial de antagonistas del receptor A<sub>2A</sub> en conjunto con agonistas o antagonistas de los receptores CB<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>, es necesario probar esta hipótesis en un modelo de la enfermedad de Parkinson, ya que se sabe que ocurren cambios en la circuitería estriatal en estos modelos. Por ejemplo, la sensibilidad de los receptores D<sub>2</sub> aumenta en modelos animales lesionados con 6 hidroxidopamina (6 – OHDA) (Prieto, *et al.*, 2009). De esta forma, una línea de investigación con el uso de modelos animales de la enfermedad de Parkinson es necesaria para entender estas respuestas, ya que estas interacciones no han sido estudiadas en estos modelos.

## 7. CONCLUSIONES

- Hemos encontrado interacciones funcionales entre los receptores D<sub>2</sub>/A<sub>2A</sub> y CB<sub>1</sub>/A<sub>2A</sub>.
- El receptor A<sub>2A</sub> es habilitado por los receptores D<sub>2</sub> y CB<sub>1</sub>.
- La interacción D<sub>2</sub>/A<sub>2A</sub> se centra en el control de los canales Ca<sub>v</sub>1.

## 8. RELEVANCIA

Las interacciones entre los receptores dopaminérgicos y otros pueden llevar a la propuesta de terapias coadyuvantes para los desordenes del movimiento tales como los Pakinsonismos.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Arch JRS, Newsholme EA (1978). The control of the metabolism and the hormonal role of adenosine. *Essays in biochemistry*. 14:82 – 123.
- Avila I, Parr-Brownlie LC, Brazhnik E, Castañeda E, Bergstrom DA, Walters JR (2010). Beta frequency synchronization in basal ganglia output during rest and walk in a hemiparkinsonian rat. *Experimental neurology*. 221:307 – 319.
- Azdad K, Gall D, Woods AS, Ledent C, Ferre S, Schiffmann SN (2009). Dopamine D<sub>2</sub> and Adenosine A<sub>2A</sub> receptor regulate NMDA-mediated excitation in accumbens neurons through A<sub>2A</sub> – D<sub>2</sub> receptor heteromerization. *Neuropsychopharmacology*. 34:972 – 986.
- Berke JD. (2011). Functional properties of striatal fast-spiking interneurons. *Frontiers in systems neuroscience*. 5:1 – 7.
- Ballion B, Frenois F, Zold CL, Chetrit J, Murer MG, Gonon F (2009). D2 receptor stimulation, but not D1, restores striatal equilibrium in a rat model of Parkinsonism. *Neurobiology of disease*. 35:376 – 384.
- Bolam JP, Hanley JJ, Booth PA, Bevan MD (2000). Synaptic organization of the basal ganglia. *Journal of anatomy*. 196:527-542.
- Brotchie JM (2003). CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor signaling in Parkinson's disease. *Current opinions in pharmacology*. 3:54 – 61.
- Canals M, Marcellino D, Fanelli F, Ciruela F, de Benedetti P, Goldberg SR, Neve K, Fuxe K, Agnati LF, Woods AS, Ferré S, Lluís C, Bouvier M, Franco R (2003). Adenosine A<sub>2A</sub>-dopamine D<sub>2</sub> receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *The Journal of biological chemistry*. 278:46741 – 46749.
- Canals M, Burgueño J, Marcellino D, Cabello N, Canela EI, Mallol J, Agnati L, Ferre S, Bouvier M, Fuxe K, Ciruela F, Lluís C, Franco R (2004). Homodimerization of adenosine A<sub>2A</sub> receptors: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *Journal of neurochemistry*. 88:726 – 734.
- Carriba P, Ortiz O, Patkar K, Justinova Z, Stroik J, Themann A, Müller C, Woods AS, Hope BT, Ciruela F, Casadó V, Canela EI, Lluís C, Goldberg SR, Moratalla R, Franco R, Ferre S (2007). Striatal Adenosine A<sub>2A</sub> and Cannabinoid CB<sub>1</sub> Receptors Form Functional Heteromeric Complexes that Mediate the Motor Effects of Cannabinoids. *Neuropsychopharmacology*. 32:2249 – 2259.

- Ciruela F, Saura C, Canela EI, Mallol J, Lluís C, Franco R (1996). Adenosine deaminase affects ligand-induced signalling by interacting with cell surface adenosine receptors. *FEBS letters*. 380:219 – 223.
- Chechova S, Venton BJ (2008). Transient adenosine efflux in the rat caudate-putamen. *Journal of neurochemistry*. 105:1253-1263.
- Chung YC, Bok E, Huh SH, Park JY, Yoon SH, Kim SR, Kim YS, Maeng S, Park SH, Jin BK (2011). Cannabinoid receptor type 1 protects nigrostriatal dopaminergic neurons against MPTP neurotoxicity by inhibiting microglia activation. *Journal of Immunology*. 190:6508 – 6517.
- DeLong MR (1990). Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends in neurosciences*. 13:281 – 285.
- DeLong MR, Wichmann T (2007). Circuits and circuit disorders of the basal ganglia. *Archives of neurology*. 64:20 – 24.
- Díaz-Cabiale Z, Hurd Y, Guidolin D, Finnman UB, Zoli M, Agnati LF, Vanderhaeghen JJ, Fuxe K, Ferre S (2001). Adenosine A<sub>2A</sub> agonist CGS 21680 decreases the affinity of dopamine D<sub>2</sub> receptors for dopamine in human striatum. *Neurochemistry*. 12:1831 – 1834.
- Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, Kathuria S, Piomelli D (2002). Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. 99:10819 – 10824.
- Egertova M, Cravatt BF, Elphick MR (2003). Comparative analysis of fatty acid amide hydrolase and CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor expression in the mouse brain: evidence of a widespread role for fatty acid amine hydrolase in regulation of endocannabinoid signaling. *Neuroscience*. 119:481 – 496.
- Fernández-Espejo E, Caraballo I, de Fonseca FR, El Banoua F, Ferrer B, Flores JA, Galan-Rodriguez B (2005). Cannabinoid CB<sub>1</sub> antagonist possess antiparkinsonian efficacy only in rats with severe nigral lesion in experimental parkinsonism. *Neurobiology of disease*. 18:591 – 601.
- Ferre S, Von Euler G, Johansson B, Fredholm BB, Fuxe K (1991). Stimulation of high affinity adenosine A<sub>2A</sub> receptors decreases the affinity of dopamine D<sub>2</sub> receptors in rat striatal membranes. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. 88:7238 – 7241.

- Ferre S, Rubio A, Fuxe K (1991). Stimulation of adenosine A<sub>2</sub> receptors induces catalepsy. *Neuroscience letters*. 130:162 – 164.
- Ferre S, O`Conor WT, Fuxe K, and Ungerstedt U (1993). The striapallidal neuron: A main locus for adenosine-dopamine interactions in the Brain. *Journal of neurosciences*. 13:5402 – 5406.
- Ferre S, Fredholm BB, Morell M, Popoli P, and Fuxe K (1997). Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends in neuroscience*. 20:482-487
- Ferre S, Lluís C, Justinova Z, Quiroz C, Orru M, Navarro G, Canela EI, Franco R, Goldberg SR (2010). Adenosine-cannabinoid receptor interactions. Implications for striatal function. *British journal of pharmacology*. 160:443 – 453.
- Ferrer B, Asbrock N, Kathuira S, Piomelli D, Giuffrida A (2003). Effects of levodopa on endocannabinoid levels in rat basal ganglia: implications for the treatment of levodopa-induced dyskinesias. *European journal of neuroscience*. 18:1607 – 1614.
- Fink JS, Weaver DR, Rivkees SA, Peterfreund RA, Pollack AE, Adler EM, Reppert SM (1992). Molecular cloning of the rat A<sub>2A</sub> adenosine receptor: selective co-expression with D<sub>2</sub> dopamine receptor in rat striatum. *Molecular brain research*. 14:186 – 195.
- Fox SH, Henry B, Hill M, Crossman A, Brotchie J (2002). Stimulation of cannabinoid receptor reduces levodopa-induced dyskinesia in the MPTP-lesioned nonhuman primate model of Parkinson's disease. *Movement disorders*. 17:1180 – 1187.
- Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden KT, Jacobson KA, Leff P, Willms M (1994). Nomenclature and classification of purinoreceptors. *Pharmacological reviews*. 46:143 – 156.
- Fuxe K (1979). Dopamine receptor agonists in brain research and as therapeutics agents. *Trends in neuroscience*. 2:1 – 4.
- Garcia-Arencibia S, Gonzalez E, de Lago JA, Ramos R, Mechoulam J, Fernandez-Ruiz (2007). Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: importance of antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties. *Brain research*. 1134:162–170.
- Gerdeman G, Lovinger M (2001). CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in rat dorsolateral striatum. *Journal of neurophysiology*. 85:468 – 471.
- Gonzalez S, Scorticati C, García-Arencibia M, de Miguel R, Ramos JA, Fernandez-Ruiz J (2006). Effects of rimonabant, a selective cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor antagonist, in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Research*. 1073:209 – 219.

- Gracia E, Pérez-Capote K, Moreno E, Barkesová J, Mallol J, Lluís C, Franco R, Cortés A, Casadó V, Canela EI (2011). A<sub>2A</sub> adenosine receptor ligand binding and signaling is allosterically modulated by adenosine deaminase. *Biochemical journal*. 435:701 – 709.
- Giuffrida A, Parsons LH, Kerr TM, Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Piomelli D (1999). Dopamine activation of endogenous cannabinoids signaling in dorsal striatum. *Nature neurosciences*. 2:358 – 363.
- Gubitz AK, Widdowson L, Kurokawa M, Kirkpatrick KA, Richardson PJ (1996). Dual signalling by the adenosine A<sub>2a</sub> receptor involves activation of both N- and P-type calcium channels by different G proteins and protein kinases in the same striatal nerve terminals. *Journal of neurochemistry*. 67:374-381.
- Hermanson DJ, Marnett LJ. 2011. Cannabinoids, endocannabinoids and Cancer. *Cancer Metastasis Reviews*. 30:599 – 612.
- Hernandez-Gonzalez O, Hernandez-Flores T, Prieto GA, Perez-Burgos A, Galarraga E, Bargas J. (2013). Reconfiguration of calcium currents in striatal projection neurons by the sequential activation of adenosine receptors. *Tesis Doctoral*.
- Hernández-López S, Bargas J, Surmeier DJ, Reyes A, Galarraga E (1997). D<sub>1</sub> receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type Ca<sup>2+</sup> conductance. *Journal of neurosciences*. 17:3334-3342.
- Hernández-López S, Tkatch T, Perez-Garci E, Galarraga E, Bárgas J, Hamm H, Surmeier (2000). D<sub>2</sub> dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca<sup>2+</sup> currents and excitability via a novel PLCβ<sub>1</sub> – IP<sub>3</sub> – calcineurin – signaling cascade. *The journal of Neuroscience*. 20:8987 – 8995.
- Herrero MT, Barcia C, Navarro JM (2002). Functional anatomy of thalamus and basal ganglia. *Child's nervous system*. 18:386 – 404.
- Hickey P, Stacy M (2012). Adenosine A<sub>2a</sub> Antagonists in Parkinson's disease: What's Next? *Current neurology and neuroscience reports*. 12:376 – 385.
- Higley MJ, Sabatini BL (2010). Competitive regulation of synaptic Ca<sup>2+</sup> influx by D<sub>2</sub> and A<sub>2A</sub> adenosine receptors. *Nature neuroscience*. 13:958 – 967.
- Hillion J, Canals M, Torvinen M, Casado V, Scott R, Terasmaa A, Hansson A, Watson S, Olah ME, Mallol J, Canela EI, Zoli M, Agnati LF, Ibanez CF, Lluís C, Franco R, Ferre S, Fuxe K (2002). Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A<sub>2A</sub> receptors and dopamine D<sub>2</sub> receptors. *The Journal of biological chemistry*. 277:18091-18097.

- Hohmann AG, Herkenham M (2000). Localization of cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor mRNA in neuronal subpopulations of rat striatum: a double-label in situ hybridization study. *Synapse*. 37:71 – 80.
- Jaakola VP, Griffith MT, Hanson MA, Cherezov V, Chien EYT, Lane JR, Ijzerman AP, Stevens RC (2008). The 2.6 angstrom crystal structure of a human A<sub>2A</sub> adenosine receptor bound to an antagonist. *Science*. 322:1211 – 1217.
- Keibian JW, Calne DB (1979). Multiple receptors for dopamine. *Nature*. 277:93 – 96.
- Kelsey JE, Harris O, Cassin J (2009). The CB1 antagonist rimonabant is adjunctively therapeutic as well as monotherapeutic in an animal model of Parkinson's disease. *Behavioral brain research*. 203:304 – 307.
- Klinger M, Freissmuth M, Nanoff Christian (2002). Adenosine receptors: G protein-mediated signalling and the role of accessory proteins. *Cellular signalling*. 14:99 – 108.
- Kravitz AV, Freeze BS, Parker PR, Kay K, Thwin MT, Deisseroth K, Kreitzer AC (2010). Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature*. 466:622 – 626.
- Kreitzer AC, Malenka RC (2008). Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron*. 60:543-54.
- Kull B, Ferre S, Arslan G, Svenningsson P, Fuxe K, Owman C, Fredholm BB (1999). Reciprocal Interactions between Adenosine A<sub>2A</sub> and Dopamine D<sub>2</sub> Receptors in Chinese Hamster Ovary Cells Co-transfected with the Two Receptors. *Biochemical pharmacology*. 58:1035 – 1045.
- Kull B, Svenningsson P, Fredholm B. (2000) Adenosine A (2A) receptors are colocalized with and activate g (olf) in rat striatum. *Molecular pharmacology*.58:771-7.
- Lewitt PA (2008). Levodopa for the treatment of Parkinson's disease. *The New England journal of medicine*. 359:2468-2476
- Lévesque M, Bédard A, Cossette M, Parent A (2003). Novel aspects of the chemical anatomy of the striatum and its efferents projections. *Journal of chemical neuroanatomy*. 26:271 – 281.
- López-Huerta VG, Carrillo-Reid L, Galarraga E, Tapia D, Fiordeliso T, Drucker-Colin R, Bargas J (2013). The balance of striatal feedback transmission is disrupted in a model of Parkinsonism. *The journal of neuroscience*. 33:4964 – 4975.
- Martire A, Tebano MT, Chiodi V, Ferreira SG, Cunha RA, Köfalvi A, Popoli P (2011). Pre-synaptic adenosine A<sub>2A</sub> receptors control cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor-mediated



inhibition of striatal glutamatergic neurotransmission. *Journal of neurochemistry*. 116:273 – 280.

- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990). Structure of cannabinoid receptor and functional expression of the cDNA. *Nature*. 346:561 – 564.
- Meghi P. (1993). Storage, release, uptake and inactivation of purines. *Drug development research*. 28:214 – 219.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiological reviews*. 78:189 – 225.
- Moreau JL, Huber G (1999). Central adenosine A<sub>2A</sub> receptors: an overview. *Brain research*. 31:65-82.
- Morelli M, Di Paolo, Wardas J, Calon F, Xiao D, Schwarzschild MA (2007). Role of adenosine A<sub>2A</sub> receptors in parkinsonian motor impairment and L-DOPA-induced motor complications. *Progress in neurobiology*. 83:293-309.
- Morgese MG, Cassano T, Cuomo V, Giuffrida A (2007). Anti-dyskinetic effects of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: role of CB1 and TRPV1 receptors. *Experimental Neurology*. 208:110 – 119.
- Murno S, Thomas KL, Abu-Shaar (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 365:61 – 65.
- Noji T, Karasawa A, Kusaka H (2004). Adenosine uptake inhibitors. *European Journal of Pharmacology*. 495:1 – 16.
- Obeso JA, Rodriguez-Oros M, Marin C, Alonso F, Zamarbide L, Lanciego JL, Roguiez-Díaz M (2004). The origin of motor fluctuations in Parkinson's disease. *Neurology*. 62:17 – 30.
- Olah ME (1997). Identification of A<sub>2A</sub> adenosine receptor domain involved in selective coupling to Gs: analysis of chimeric A<sub>1</sub>/A<sub>2A</sub> adenosine receptors. *The journal of biological chemistry*. 272:337 – 344.
- Ostergaard K, Sunde NA (2006). Evolution of Parkinson's disease during 4 years of bilateral deep brain stimulation of the subthalamic nucleus. *Movement Disorders*. 21:624 – 631.
- Pérez-Garci E, Bargas J, Galarraga E (2003). The role of Ca<sup>2+</sup> channels in the repetitive firing of striatal projection neurons. *Neuroreport*. 14:1253-1256.
- Pertwee RG, Wickens AP (1991). Enhancement by chlordiazepoxide of catalepsy induced in rats by intravenous or intrapallidal injections of enantiomeric cannabinoids. *Neuropharmacology*. 30:237 – 244.

- Pertwee RG (1997). Pharmacology of cannabinoid CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors. *Pharmacology and therapeutics*. 74:129 – 180.
- Pinna A, Corsi C, Carta AR, Valentini V, Pedata F, Morelli M (2002). Modification of adenosine extracellular levels and adenosine A<sub>2A</sub> receptor mRNA by dopamine denervation. *European journal of pharmacology*. 446: 75-82.
- Prieto GA, Pérez-Burgos A, Fiordelisio T, Salgado H, Galarraga E, Druker-Colín R, Bargas J (2009). Dopamine D<sub>2</sub>-class receptor supersensitivity as reflected in Ca<sup>2+</sup> current modulation in neostriatal neurons. *Neuroscience*. 164:345 – 350.
- Sieradzan KA, Fox SH, Hill M, Dick JP, Crossman AR, Brotchie JM (2001). Cannabinoids reduce levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease: a pilot study. *Neurology*. 57:2108 – 2111.
- Sciotti VM, Park TS, Berne RM, Van Wylen DG (1993). Changes in extracellular adenosine during chemical or electrical brain stimulation. *Brain Research*. 613: 16-20.
- Schiffmann SN, Fisone G, Moresco R, Cunha RA, Ferré S (2007). Adenosine A<sub>2A</sub> receptors and basal ganglia physiology. *Progress in neurobiology*. 83:277 – 292.
- Smith Y, Bevan MD, Shink E, Bolam JP (1998). Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience*. 86:353 – 387.
- Soares J, Kliem MA, Betarbet R, Greenamyre T, Yamamoto B, Wichmann T (2004). Role of the external pallidal segment in primate parkinsonism: Comparison of the effects of 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine-Induce parkinsonism and lesion of the external pallidal segment. *Neurobiology of disease*. 24:6426 – 6417.
- Stacy M (2009). Medical treatment of Parkinson disease. *Neurologic Clinics*. 329:2468-2476.
- Stella N, Schweitzer P, Piomelli D (1997). A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*. 388:773–778.
- Surmeier DJ, Carrillo-Reid L, Bargas J (2011). Dopaminergic modulation of striatal neurons, circuits and assemblies. *Neuroscience*. 198:3 – 18.
- Tachibana Y, Iwamuro H, Kita H, Takada M, Nambu A (2011). Subthalamo-pallidal interactions underlying parkinsonian neuronal oscillations in the primate basal ganglia. *The european journal of neuroscience*. 34:1470 – 1484.
- Takakusaki K, Saitoh K, Harada H, Kashiwayanagi M (2004). Role of basal ganglia-brainstem pathways in the control of motor behaviors. *Neuroscience research*. 150:137 – 151.

- Tepper JM, Tecuapetla F, Koós T, Ibáñez-Sandoval O (2010). Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons. *Frontiers in neuroanatomy*. 4:1-18.
- Tebano MT, Martire A, Chiodi V, Pepponi R, Ferrante A, Domenici MR, Frank C, Chen JF, Ledent C, Popoli P (2009). Adenosine A<sub>2A</sub> receptors enable the synaptic effects of cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor in the rodent striatum. *Journal of neurochemistry*. 110:1921 – 1930.
- Thorn JA, Jarvis SM (1996). Adenosine transporters. *General pharmacology: The vascular system*. 27:613 – 620.
- Tozzi A, Tscherter A, Belcastro V, Tantucci M, Costa C, Picconi B, Centonze D, Calabresi P, Borsini F. 2007. Interaction of A<sub>2A</sub> adenosine and D<sub>2</sub> dopamine receptors modulates corticostriatal glutamatergic transmission. *Neuropharmacology*. 53:783 – 789.
- Wichmann T, Dostrovsky JO (2011). Pathological basal ganglia activity in movement disorders. *Neuroscience*. 198:232 – 244.
- Wirkner K, Assmann H, Köles L, Gerevich Z, Franke H, Nörenberg W, Boehm R, Illes P (2000). Inhibition by adenosine A<sub>2A</sub> receptor of NMDA but not AMPA currents in rat neostriatal neurons. *British journal of pharmacology*. 130:259 – 269.
- Xu H, Chen R, Cai X, He D (2007). Differential effects of activating D1 and D2 receptors on electrophysiology of neostriatal neurons in a rat model of Parkinson's disease induced by paraquat and maneb. *Neuroscience research*. 71:411-420
- Yan Z, Surmeier J (1996). Muscarinic (m2/m4) receptors reduce N- and P-type Ca<sup>2+</sup> currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a fast, membrane-delimited, G-protein pathway. *The journal of neuroscience*. 16:2592 – 2604.