



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FES IZTACALA  
BIOMEDICINA

**Estudio del efecto de la 1-metilxantina sobre receptores de Adenosina A<sub>2A</sub> en un modelo experimental de la enfermedad de Parkinson.**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**Luis Clemente Jiménez Botello**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Doctor en Ciencias, María Rosa de Lourdes Ávila Costa  
FES-IZTACALA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: Doctor en Ciencias, Gabriel Gutiérrez Ospina  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM  
Doctor en Ciencias, Teresa Fortoul Van der Goes  
Facultad de Medicina, UNAM**

**MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE, 2014.**



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas celebrada el día 5 de marzo de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de DOCTOR EN CIENCIAS del alumno LUIS CLEMENTE JIMÉNEZ BOTELLO, con número de cuenta 406013516, con la tesis titulada "Estado del efecto de la 1-metilxantina sobre receptores de adenosina A2A en un modelo experimental de la enfermedad de Parkinson", realizada bajo la dirección de la UNA, MARÍA ROSA DE LOURDES ÁVILA COSTA:

Presidente:	DR. JORGE ACEVES ALÍZ
Vocal:	DR. DANIEL MARÍNEZ FONG
Secretario:	DR. GABRIEL GUERREROS DOMINA
Suplente:	DRA. VERÓNICA ANAYA MARTÍNEZ
Secretaría:	DR. ANDRÉS ELIUCAS ELL RODRÍGUEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR NI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Unversitaria, D.F., a 9 de septiembre de 2014.

*María del Curo Arzñendi Arriaga*

DRA. MARÍA DEL CURO ARZÑENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



cc p. Expediente del (la) interesado (a)

## **Agradecimientos**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM.

Al CONACYT por el apoyo otorgado a través de la BECA 104765

Al apoyo recibido por parte de PAPIIT-DGAPA UNAM-215708

A los miembros del Comité Tutor:

- D en C María Rosa de Lourdes Ávila Costa
  - D en C Gabriel Gutiérrez Ospina
  - D en C Teresa Fortoul Van der Goes

## **Agradecimientos a título personal**

A Dios por esta vida y la oportunidad de vivir cuanto me ha sido posible y en particular por permitirme lograr esta meta.

A mi esposa Laura y mi hijo Alan, por siempre apoyarme incluso en los momentos más difíciles, por siempre tener una sonrisa para mí y sobre todo por su amor incondicional.

A mis padres y mi hermana por todo lo que han hecho por mí como familia.

Al Dr. Luis Miguel Beristain y la Dra Sonia Mujaes por alentarme y apoyarme siempre.

A mis amigos del Laboratorio 13 del Departamento de Fisiología del CINVESTAV (¿hay otro?), en especial a Arturo y a Vale, a Verito, a Paty y por supuesto a mi Supertocayo (Luis Fernando), compañero de mil batallas y diez mil patoaventuras.

A mis amigos del Laboratorio de Neuromorfología de la UIICSE, Chucho, Paty, José Luis, Anita y Fidencio.

A mi amigo César (Nene), por su amistad sincera y apoyo solidario en todo momento, en especial cuando los días se tornaron oscuros.

A mi amiga Lux, a mis amigos Urrusti, Félix, Hernán y al Camarada Víctor por siempre escucharme y apoyarme solidariamente ante cualquier situación.

Al Superagente B (Balam), Superagente P (Alfonso) y al buen Enrique, por su valioso apoyo en las etapas finales de este proceso. También a Salaciel, Juvetino, Robert y Aris por su amistad y ser parte del equipo en la lucha contra el lado oscuro de la fuerza.

A mis amigos Alfonso, Tecili y su bebé, por su amistad y apoyo sincero para conmigo y mi familia.

A la Dra Paty Segura y a mi Compadre Científico Carlos del INER, por motivarme a cerrar este ciclo.

A la Srita. Bety y la Srita. Ale por siempre apoyarme y ayudarme en todo lo que necesito.

Al Dr. Picazo, al Dr. Correa y al Dr Soriano, de la SEPI de la ESM-IPN, por su apoyo.

A mis amigos Carlos Amadeo, Lamberto, Rodrigo y Omar, por apoyarme siempre que necesito ayuda y en particular en la recta final de este proceso.

## **Dedicatoria**

Para mi esposa Laura y para mi hijo Alan.

Y

Para todas las personas que trabajan siempre por un mundo mejor para todos.

## Índice

	<b>Página</b>
• Lista de Figuras y Cuadros.....	1
• Resumen en español.....	2
• Resumen en Inglés (Abstract).....	3
• Introducción.....	4
• Objetivo General.....	6
○ Objetivos específicos.....	6
• Antecedentes.....	7
○ L-DOPA.....	7
○ Adenosina.....	10
○ Receptores Adenosina A <sub>2A</sub> .....	11
○ Tratamiento con antagonistas A <sub>2A</sub> .....	13
○ Metilxantinas.....	15
○ Cafeína.....	16
○ 1-Metilxantina.....	18
• Justificación.....	19
• Hipótesis.....	20
• Metodología y Resultados.....	21
○ Docking.....	21
○ Efecto de la 1-Metilxantina sobre la actividad motora libre de la rata.....	24
○ Estudio del efecto ansiogénico de la 1-Metilxantina.....	26
○ Modelo animal de la enfermedad de Parkinson.....	28
▪ Conducta de giro sin apomorfina.....	29
▪ Conducta de giro con apomorfina.....	30
• Discusión.....	32
• Conclusión.....	37
• Referencias.....	38
• Anexo A(Artículo).....	53

## Lista de figuras y cuadros

- **Figura 1.** Antagonismo funcional entre los receptores Adenosina A<sub>2A</sub>-Dopamina D<sub>2</sub>.
- **Figura 2.** Biotransformación de la 1,3,7-Metilxantina.
- **Figura 3.** Moléculas listas para ser evaluadas por Docking.
- **Figura 4.** Interacción Molecular por Docking.
- **Figura 5.** Deltas G de diferentes moléculas con núcleo xantínico.
- **Figura 6.** Cajas para medición de la actividad motora libre.
- **Figura 7.** Actividad locomotora libre en la rata sin lesión.
- **Figura 8.** Modelo de conducta de enterramiento (Burying behavior).
- **Figura 9.** Conducta de enterramiento (Burying behavior).
- **Figura 10.** Lesión del haz medial del cerebro anterior (mfb) con 6-OHDA y modelo de giro inducido por apomorfina.
- **Figura 11.** Giros contralaterales sin Apomorfina.
- **Figura 12.** Modelo de giro inducido por apomorfina en rata con lesión unilateral del haz medial con 6-OHDA.
- **Figura 13.** Receptores Adenosina A<sub>2A</sub> y Dopamina D<sub>2</sub> en los ganglios basales.



## Resumen

La enfermedad de Parkinson es un importante desorden neurodegenerativo y de evolución lenta, con síntomas motores y no motores, que afectan seriamente la calidad de vida del paciente. En cuanto al tratamiento, el agente antiparkinsoniano más utilizado es la L-DOPA, sin embargo es también el principal agente discinético. En los últimos años, los antagonistas de los receptores adenosina  $A_{2A}$  han demostrado ser una ayuda valiosa en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

Uno de los antagonistas  $A_{2A}$  más conocidos y estudiados es la 1,3,7-Metilxantina, sin embargo esta molécula después de ser absorbida, se desmetila en el hígado y se transforma en 1-Metilxantina, siendo ésta molécula principal derivado de la misma. La 1-metilxantina, es una molécula poco estudiada y se sabe poco de sus efectos, en particular sobre los ganglios basales, pero por su estructura base y al ser derivado de la cafeína es posible que tenga también afinidad por los receptores  $A_{2A}$  y que también actúe como antagonista  $A_{2A}$ .

El propósito de este estudio fue el conocer el efecto de la 1-Metilxantina sobre un modelo animal de la enfermedad de Parkinson, realizando Docking, estudios de la actividad motora libre y ansiedad en rata sin lesión; y finalmente utilizando el modelo de giro inducido por apomorfina en ratas lesionadas con 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Los resultados sugieren que la 1-Metilxantina tiene un efecto similar y en algunos casos discretamente superior a la cafeína, tanto en afinidad por los receptores Adenosina  $A_{2A}$  ( $A_{2A}R$ ), como en actividad motora libre y en el modelo de giro inducido por apomorfina.

De lo anterior podemos concluir, que la 1-Metilxantina es una molécula que podría tener un valioso potencial como coadyuvante farmacológico en la enfermedad de Parkinson, lo cual permitirá reducir la cantidad de L-DOPA administrada a los pacientes y de esta manera reducir las discinesias relacionadas al uso continuo de este medicamento.

## Abstract

Parkinson's disease is an important neurodegenerative disorder that presents a slow evolution, with motor and non-motor symptoms, these seriously affect patient quality of life. About treatment, L-DOPA is the most used antiparkinsonian agent, however is also the principal dyskinesic agent.

In last years, A<sub>2A</sub> receptor antagonists have been showed to be a valuable help in Parkinson's disease treatment.

One of the most studied and recognized A<sub>2A</sub> antagonists is 1,3,7-Methylxanthine, however after their intestinal absorption, in the liver this molecule suffers demethylation and is transformed in 1-Methylxanthine, this molecule is their principal derivate.

1-Methylxanthine, is a slightly studied molecule and there is also few knowledge about its effect, particularly in the basal ganglia, but taking account their base structure and being a caffeine derivate it is possible that this molecule have affinity for A<sub>2A</sub> adenosine receptors and also could act as an A<sub>2A</sub> antagonist.

The aim of this study, was to know 1-Methylxanthine effect on an animal model of Parkinson's disease, using Docking, studies about free motor activity in rat without lesion, anxiety models and finally using apomorphine circling induced behavior test in rats with intracerebral 6-OHDA lesion. Results suggests that 1-Methylxanthine has a similar effect and in some cases a lightly superior than caffeine, as in A<sub>2A</sub> receptors affinity as in free motor activity and in Apomorphine induced circling behavior.

Based on the presented evidence, we can conclude that 1-Methylxanthine is a molecule that could have a promising potential as pharmacological coadjuvant in Parkinson's disease, which let to reduce L-DOPA dosage in patients and by this way, to reduce dyskinesias related to their continuous usage.

## Introducción

### La enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común en humanos (Chen, Yung and Chan, 2004), después del Alzheimer (McDonald, Richard y Delong, 2003), con una prevalencia de al menos 2% en individuos mayores de 70 años (Lazic and Baker, 2003), con un pico de inicio entre los 55 a 60 años (McDonald, Richard and Delong, 2003), por esta razón es considerada una enfermedad de los adultos mayores (Lees, 2005).

La enfermedad de Parkinson es producida por la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra pars compacta* (Giasson and Lee, 2003), que afecta la vía nigroestriatal y la subsecuente liberación de dopamina en el cuerpo estriado (Matsubara, Shoji and Abe, 2002). Esta pérdida neuronal es también observada en el área ventral tegmental, *locus coeruleus*, núcleo basal de Meynert y el núcleo dorsal del rafe, produciendo múltiples alteraciones motoras y conductuales (Boosbom,Stoffers and Wolters, 2004), sin embargo la causa precisa de la muerte celular es aún desconocida (Chen, Yung and Chan, 2004).

La enfermedad de Parkinson se caracteriza principalmente por ciertas alteraciones motoras, también denominadas “signos cardinales”: temblor, inestabilidad postural, bradicinesia, alteraciones en el equilibrio y en la marcha, así como dificultad para iniciar movimientos voluntarios (Benabid, 2003; Boosbom and Wolters, 2004). Con base en lo anterior, algunos autores denominan a padecimientos con características clínicas similares como “parkinsonismo” (Bhat and Weiner, 2005). En ausencia de los signos cardinales antes citados y como un hallazgo temprano de la enfermedad en algunos casos se observan deformaciones de la mano y del pie (Ashour, Titner and Jankovic, 2005).

En esta enfermedad también se presentan síntomas no motores como demencia “frontal subcortical” (Collins *et al.* 2004) con cuerpos de Lewy (Burn and McKeith, 2003) (Boosbom,

Stoffers and Wolters, 2004; Bhat and Weiner, 2005; Geser, 2005), que recibe el nombre de Síndrome de Demencia con cuerpos de Lewy (Fernandez, Wu and Ott, 2003).

La demencia está presente en el 25% de los pacientes con enfermedad de Parkinson idiopática con características clínicas descritas en el ICD-10 y el DSM-IV (Fuchs *et al.* 2004).

El síntoma no motor más incapacitante de la enfermedad de Parkinson es la depresión, (Mentis and Delalot, 2005) la cual es observada en más del 50% de los pacientes (McDonald, Richard and Delong, 2003; Leentjens, 2004; Lagopoulus *et al.* 2005) y se asocia con síntomas negativos como alteraciones cognitivas (Aarsland, Ballard and Halliday, 2004) así como del sueño REM (Boeve, Silber and Ferman, 2004), alucinaciones visuales y auditivas (Kulisevsky and Roldan, 2004) (Ballard, 2004; Boosbom and Wolters, 2004) y también confusión fluctuante (Collins *et al.* 2004).

Otros síntomas no motores observados son la náusea, problemas para deglutir saliva, estreñimiento y problemas genitourinarios como disfunción eréctil (Frucht, 2004; Chaudhuri, Healy and Schapira, 2006).

Todos los síntomas motores y especialmente los no motores, están presentes en el 90% de los pacientes parkinsonianos, los cuales afectan negativamente su calidad y esperanza de vida (Muller, 2001; Lagopoulus *et al.* 2005; Hanagasi and Emre, 2005), además de cuadruplicar el costo de sus cuidados (Chaudhuri, Yates and Martinez-Martin, 2005).

La terapéutica de la enfermedad de Parkinson se relaciona siempre con fármacos dopaminérgicos como la L-DOPA o algún agonista de receptores dopaminérgicos, sin embargo se ha demostrado que la L-DOPA no es la panacea, ya que como se mencionará posteriormente el uso crónico de este fármaco produce más perjuicios que beneficios de índole motor y no motor (Obeso *et al.* 2000).

## **Objetivo General**

Estudiar el efecto de la 1-Metilxantina sobre un modelo animal de la enfermedad de Parkinson, producido por la lesión unilateral con 6-hidroxidopamina.

## **Objetivos específicos**

- Estudiar la afinidad de la 1-Metilxantina por el receptor  $A_{2A}$  de forma predictiva mediante Docking.
- Analizar el efecto de la 1-Metilxantina sobre la actividad motora en rata sin lesión.
- Evaluar el efecto ansiogénico de la 1-Metilxantina en la rata sin lesión.
- Probar en el modelo animal de la enfermedad de Parkinson de ratas con lesión intracerebral por 6-OHDA, el efecto de la 1-Metilxantina sobre la actividad motora de la rata en modelo de giro inducido por apomorfina.

## **Antecedentes**

### **L-DOPA**

A finales de la década de los 60's, el único fármaco antiparkinsoniano disponible era la L-DOPA, un precursor metabólico de la dopamina. Debido a su notable efectividad en las etapas tempranas de la enfermedad de Parkinson, la L-DOPA sigue siendo el principal fármaco antiparkinsoniano (Evans and Lees, 2004; LeWitt and Nyholm, 2004; Jenner, 2003; Jenner, 2005), cabe mencionar que aún cuando es efectivo para algunos síntomas motores no evita la progresión de la enfermedad (Chen, 2003).

Sin embargo, en los últimos 20 años se ha demostrado que es causante de discinesias (alteraciones motoras) (Grondin *et al.* 1999; Jenner, 2000; Muller 2001; Lazic and Barker, 2003; Koller and Tse, 2004; Lang and Obeso 2004), como movimientos coreiformes, fluctuaciones motoras (“desuso” y fenómeno de “on-off”) (Jankovic, 2005), kicking (movimientos de las piernas como si pateara) y freezing (el paciente se queda inmóvil), estas alteraciones reflejan cambios en estructuras postsinápticas, en particular en los receptores a dopamina (Thanvi and Lo, 2004), debido a la administración crónica de L-DOPA en dosis antiparkinsonianas (Chase, Engber and Mouradian, 1994).

Para desarrollar discinesias inducidas por L-DOPA hay tres factores de riesgo: el empleo de dosis altas de éste fármaco, el inicio temprano de la medicación y la severidad de la enfermedad (Jimenez-Jimenez, Molina and Orti-Pareja, 1999). Tomando en cuenta todo lo descrito, se ha propuesto un síndrome de desregulación por dopamina, que ocurre cuando la dosis de reemplazo de dopamina, es mucho mayor a la necesaria para tratar los desórdenes motores (Evans and Lees, 2004).

En casi 70% de los pacientes parkinsonianos, se han reportado alteraciones nocturnas tales como pesadillas y sueños vívidos, las cuales al parecer dependen del tratamiento crónico con L-DOPA

(Barone *et al.* 2004). También algunos pacientes incluso desarrollan psicosis, un problema común e importante asociado a tratamientos prolongados. Con menor frecuencia se observan cambios cognitivos, apraxia, déficit en el procesamiento de lenguaje (Kang and Bronstein, 2004; Levin and Katzen, 2005) y en la velocidad del habla (De Letter *et al.* 2006). Como es de esperarse, todos estos síntomas afectan seriamente la calidad de vida del paciente.

La discinesia inducida por L-DOPA, es una complicación común del tratamiento a largo plazo de la enfermedad de Parkinson, el cual está relacionado a la sobreactivación de receptores dopaminérgicos a pesar de ello no parece ser explicación suficiente (Crossman, 2000). Sin embargo, parece tener una relación importante con la depleción de la dopamina estriatal, ya que la discinesia es mucho más frecuente en etapas avanzadas de la enfermedad de Parkinson, cuando hay mayor pérdida de las terminales dopaminérgicas (Hout *et al.* 2013). Se ha propuesto también que la plasticidad sináptica posiblemente esté relacionada con las discinesias inducidas por el uso crónico de L-DOPA (Bargiostas and Konitsiotis, 2013).

Incluso hay reportes que la terapia con L-DOPA acelera la evolución de la enfermedad, por su neurotoxicidad sobre las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra *pars compacta*. Lo anterior, debido a un incremento en la producción de radicales libres, ya que estas moléculas son los principales metabolitos de la transformación de L-DOPA a dopamina y es posible que causen estrés oxidativo y consecuentemente la muerte de las neuronas dopaminérgicas (Koller y Tse, 2004).

En la última década, el tratamiento de la enfermedad de Parkinson ha tenido cambios importantes, con nuevos fármacos para tratar los síntomas cardinales y las manifestaciones no motoras de la enfermedad (Frucht, 2004). Hay varias propuestas farmacológicas que podemos agrupar en terapias dopaminérgicas y no dopaminérgicas (Muller, 2001). En cuanto a la terapia no dopaminérgica, varios autores han enfocado su atención en los receptores para AdenosinaA<sub>2A</sub>

(A<sub>2A</sub>R), es importante destacar que están altamente expresados en las terminales estriato-palidales (Dixon *et al.* 1996), en un heterodímero funcional con el receptor D<sub>2</sub>, ambos son antagonistas en su actividad sobre la terminal GABAérgica estriatopalidal (Chen, 2003) y modulan la transmisión dopaminérgica y glutamatérgica en la vía indirecta (Hout *et al.* 2013).

Se ha observado que los antagonistas de los receptores Adenosina A<sub>2A</sub> modulan los efectos de la administración crónica de L-DOPA en la plasticidad sináptica, actuando a través de la regulación de algunos neuropeptidos como dinorfina y encefalina (Bargiostas and Konitsiotis, 2013). De hecho, se sugiere que la activación de los receptores A<sub>2A</sub> está muy relacionada con las complicaciones motoras inducidas por L-DOPA, por lo cual el uso de antagonistas A<sub>2A</sub> que bloqueen estos receptores, es considerado como un valioso apoyo que proporcionara importantes beneficios clínicos para la vida del paciente (Bove *et al.* 2002).



## **Adenosina**

La adenosina es una molécula que se forma a través de la defosforilación del ATP intracelular y se moviliza al exterior celular a través de la membrana gracias a transportadores de nucleósidos que son bidireccionales, pero la adenosina que actúa en la terminal sináptica se forma principalmente por acción de la ectonucleasa sobre las moléculas de ATP que se liberan conjuntamente con los neurotransmisores (ejemplo, glutamato) en la terminal sináptica (Schifmann *et al.* 2007).

El ribonucleósido adenosina es un regulador de diversas funciones neuronales y es además un marcador de daño cerebral, ya que se acumula rápidamente durante la respuesta aguda al estrés, por ejemplo durante condiciones de privación de oxígeno como sucede en la isquemia cerebral o alto consumo de energía como ocurre durante una crisis convulsiva. Puede modular muchas funciones neuronales y gliales en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas, así como la susceptibilidad a convulsiones, daño tisular y reparación y respuesta inmune en el cerebro (Boison, 2011).

La adenosina, ejerce gran variedad de efectos en el sistema nervioso y tejido periférico, ya que es un potente mediador biológico y tiene la capacidad de modular la actividad celular y tisular, en muchas estructuras incluyendo al cerebro (Kase, 2001), y puede ser considerada como un neurotransmisor del sistema nervioso central, ya que actúa a través de diferentes subtipos de receptores acoplados a proteínas G, en particular en el estriado y la terminal estriatopalidal, donde funciona como un modulador de la neurotransmisión dopaminérgica y glutamatérgica, razón por la cual tiene una importante implicación en el tratamiento de diversas neuropatologías relacionadas al estriado (Ferre *et al.* 2008).

Desde hace algunos años se ha demostrado un efecto pro-neurotóxico de la Adenosina, lo cual sugiere que los fármacos que bloqueen su efecto pueden conferir neuroprotección en diversos padecimientos neurodegenerativos (Morelli *et al.* 2010).

### **Receptores Adenosina A<sub>2A</sub>**

Los receptores de adenosina, anteriormente llamados “purinoreceptores”, se pueden clasificar en 4 tipos: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> y A<sub>3</sub>. Estos receptores se encuentran distribuidos en todo el organismo, sin embargo es el tipo A<sub>2A</sub>, el que llama la atención por su importancia en la regulación de la vía indirecta de los Ganglios Basales mediando el efecto de la dopamina. Este receptor cuya codificación genética se haya en el cromosoma 22, se encuentra acoplado a proteínas Gs tiene como su principal agonista a la purina conocida como adenosina, la cual es bien sabido que puede tener un origen intra o extracelular y su expresión puede ser estimulada por la proteínkinasa C y por la hipoxia celular (Fredholm *et al.* 2001).

Se ha propuesto que los receptores para adenosina tipo A<sub>2A</sub>, pueden tener un efecto neuroprotector en ciertas patologías (Ongini *et al.* 1997; Chen *et al.* 2001; Popolli *et al.* 2002) y que los antagonistas para receptores A<sub>2A</sub> pueden tener un efecto benéfico en la enfermedad de Parkinson, estimulando la actividad motora (Richardson *et al.* 1997; Grondin *et al.* 2004). De hecho desde hace algunos años se propuso a los antagonistas para receptores A<sub>2A</sub>, como los blancos para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (Chen, 2003; Blandini, 2003). Su mecanismo de acción sobre los ganglios basales, se ha establecido y se sabe que modula la actividad de las vías directa e indirecta (Silkis, 2001), lo cual sugiere que podrían ser usados para mejorar los síntomas de la enfermedad (Bara-Jiménez, 2003; Standaert, 2003).

Se ha demostrado un antagonismo funcional entre receptores A<sub>2A</sub> y D<sub>2</sub> (Fredholm and Svenningsson, 2003), ya que al activarse los receptores A<sub>2A</sub> estos a través de Proteínas Gs estimulan la enzima adenilciclase mientras que los receptores D<sub>2</sub> colocalizados en la misma

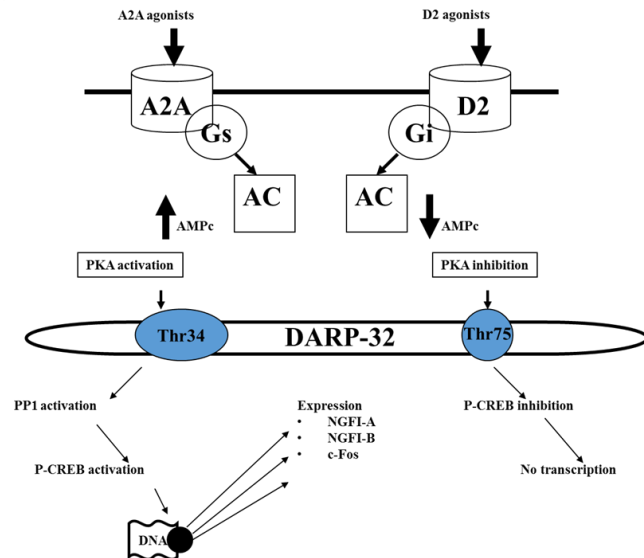
terminal la inhiben a través de Proteínas Gi (**Figura 1**) (Morelli, 2003) modulando la transmisión GABAérgica en la vía indirecta (Mori and Shindou, 2003).

Se ha observado que el heterodímero A<sub>2A</sub>/D<sub>2</sub>, tiene implicación directa en la modulación de la señalización por MAPK mediada por Ca<sup>2+</sup> y la calmodulina, la cual se enlaza con la porción carboxilo terminal del receptor Adenosina A<sub>2A</sub> del heterodímero A<sub>2A</sub>/D<sub>2</sub> (Ferré *et al.* 2010 b).

Lo anterior ha incrementado los trabajos relacionados a comprender cómo puede modificarse la función del heterodímero A<sub>2A</sub>/D<sub>2</sub>, a través del estudio de sus sitios alostéricos (Gao *et al.* 2005). Se ha sugerido

desde hace algunos años que las interacciones intramembranales de los receptores A<sub>2A</sub>/D<sub>2</sub> vía heteromerización heteroméricas A<sub>2A</sub>-D<sub>2</sub>, son muy importantes y pueden proveer una nueva estrategia terapéutica para los pacientes con enfermedad de Parkinson, discinesias e incluso psicosis (Agnati *et al.* 2003; Ferré *et al.* 2007)

Cabe mencionar que en personas sanas, los receptores Adenosina A<sub>2A</sub>, participan en la planeación y ejecución del movimiento voluntario, pero en el estado parkinsoniano la actividad del receptor Adenosina A<sub>2A</sub> está incrementada y esto puede inhibir la actividad motora (Bargiostas and Konitsiotis, 2013).



**Figura 1. Antagonismo funcional entre los receptores Adenosina A<sub>2A</sub>-Dopamina D<sub>2</sub>.** Los niveles intracelulares de AMPc, son modificados por la activación de los receptores, lo cual modula la actividad de la PKA y esto la fosforilación de diferentes partes de la DARP-32. (Basado en Morelli, 2003)

### **Tratamiento con antagonistas A<sub>2A</sub>**

Los antagonistas A<sub>2A</sub> han llegado a ser una terapia esperanzadora para la enfermedad de Parkinson (Aoyama, Kase y Borrelli, 2000; Agnati *et al.* 2004). Algunos estudios dicen que en la enfermedad de Parkinson, la responsable de las discinesias por L-DOPA es la sobre activación de los receptores de adenosina A<sub>2A</sub>. Con base en esto algunos autores proponen que los antagonistas de los receptores Adenosina A<sub>2A</sub> pueden disminuir estos efectos adversos (Bara-Jimenez *et al.* 2003). Con base a los resultados en modelos animales de Parkinson, en particular en monos tratados con MPTP se ha considerado también a los antagonistas de los receptores A<sub>2A</sub> como antiparkinsonianos que no provocan discinecias. (Kanda *et al.* 1998; Kuwana *et al.* 1999; Kanda *et al.* 2000).

Por otra parte estos antagonistas han probado ser eficientes inhibidores de la monoaminoxidasa B, al producir mejoramiento de la actividad motora y un efecto neuroprotector en modelos animales de la enfermedad de Parkinson (Petzer *et al.* 2003).

Ahora sabemos que los antagonistas A<sub>2A</sub>, cuando son administrados junto con L-DOPA, pueden producir un efecto sinérgico que conlleva a una reducción de la dosis de L-DOPA necesaria para producir un notable efecto terapéutico (Kanda *et al.* 2000), esto a través de la estimulación el receptor para Dopamina D<sub>2</sub>, cuando se antagoniza el receptor A<sub>2A</sub> (Stromberg *et al.* 2000). Además se observa una importante reducción en los efectos colaterales de la L-DOPA en el sistema motor (Müller, 2013).

Los antagonistas A<sub>2A</sub> también pueden ayudar a aliviar complicaciones neuropsiquiátricas como la depresión y la ansiedad asociadas con la enfermedad de Parkinson (Knutsen and Weiss, 2001; Le Witt and Nyholm, 2004). También se ha reportado en modelos animales que los antagonistas de los receptores Adenosina A<sub>2A</sub> podrían tener un efecto neuroprotector, sin embargo existen factores neurotróficos como el GDNF, cuyo efecto podría ser afectado por los antagonistas de los receptores Adenosina A<sub>2A</sub> (Sebastiao and Ribeiro, 2009).

Se ha demostrado también que el incremento de calcio intracelular dispara la liberación de glutamato por parte de los astrocitos y que la adenosina puede triplicar la cantidad de glutamato liberado en astrocitos hipocampales en cultivo, esto debido a la activación del receptor Adenosina A<sub>2A</sub> y la subsecuente activación de la PKA lo cual nos permite proponer que los fenómenos de excitotoxicidad debida a glutamato podrían ser disminuidos por antagonistas de los receptores Adenosina A<sub>2A</sub> (Nishizaki, 2004).

Actualmente existen diversos fármacos, que actúan como inhibidores selectivos de los receptores adenosina A<sub>2A</sub> que se encuentran en evaluación para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (Fase I, II y III) y es muy importante recalcar que se han reportado interesantes resultados relativos al bloqueo de receptores Adenosina A<sub>2A</sub> y la modulación de las discinecias en modelos animales de la enfermedad de Parkinson (Armentero *et al.* 2011).

Es muy importante destacar que existen unas moléculas llamadas metilxantinas, las cuales parecen compartir en diferentes grados una propiedad básica: ser antagonistas de los receptores A<sub>2A</sub> (Jenner, 2003). Tomando en cuenta las complicaciones relacionadas a la terapia crónica con L-DOPA y diversos agonistas dopaminérgicos, se ha buscado alternativas a estas moléculas, como los antagonistas de los receptores Adenosina A<sub>2A</sub>, estos han sido clasificados como basados en xantina y no basados en xantina, los basados en xantina y más conocidos desde hace años son las metilxantinas cafeína y teofilina, las cuales tienen afinidad moderada por el receptor Adenosina A<sub>2A</sub> (Shook and Jackson, 2011).

## Metilxantinas

Consumidas desde hace miles de años, las metilxantinas están presentes en bebidas como el café, té o chocolate, y muchas de sus propiedades son atribuidas a estas sustancias.

Las metilxantinas son básicamente 3 moléculas naturales: cafeína, theobromina y teofilina, pero existen otras moléculas derivadas de estas. Todas las metilxantinas tienen semejanza estructural a la xantina, solo que con radicales metilos en diferentes posiciones, debido a esto son llamadas metilxantinas.

La theobromina es un antagonista débil del receptor  $A_{2A}$  (Shi and Daly, 1999). No obstante, podría ser importante en el apoyo farmacológico del paciente parkinsoniano, ya que esta sustancia es ampliamente consumida en todas las edades, en diversas partes del mundo y también en dosis posiblemente mucho mayores que la cafeína y teofilina.

Algunos experimentos han mostrado que también la teofilina puede ser considerada como un antiparkinsoniano debido a que puede bloquear receptores Adenosina  $A_{2A}$  (Shi and Daly, 1999; Kulisevsky *et al.* 2002). De hecho es considerada un antagonista no específico de receptores de Adenosina  $A_{2A}$  (Mathur and Gupta, 1999), ya que al parecer también tiene efectos positivos en algunos modelos animales de la enfermedad de Parkinson (Garrett and Holtzman, 1995).

Como fue mencionado, los receptores Adenosina  $A_{2A}$ , son bloqueados por la cafeína (Daly and Fredholm, 1998; Fredholm *et al.* 2001), esta molécula ha sido considerada junto con la nicotina, un estimulante psicomotor y ha demostrado un efecto benéfico sobre las alteraciones motoras que se observan en la enfermedad de Parkinson (Fisone *et al.* 2004; Ross and Petrovich, 2001).

## Cafeína

La Cafeína (1,3,7-trimetilxantina) es un alcaloide con una estructura química semejante a las purinas y por ende a la adenosina. Se encuentra de manera natural en el café y en bebidas de cola, además de que se ha encontrado en más de 600 especies diferentes de plantas alrededor del mundo (Brachtel and Richter, 1992; Busto *et al.* 1983).

La cafeína tiene múltiples efectos en las arterias cerebrales y arteriolas, por lo cual tiene influencia sobre la perfusión cerebral, tanto en reposo como cuando se incrementa la actividad sináptica (Pelligrino, Xu and Vetri, 2010). El efecto de la cafeína sobre los receptores para Adenosina A<sub>2A</sub> también ha sido atribuido a sus metabolitos (Fredholm *et al.* 2001). Se ha reportado también que la cafeína induce apoptosis *in vitro* (Jang *et al.* 2004) pero a dosis equivalentes a más de 25mg/Kg (dosis tóxica 15mg/Kg).

La atención sobre el efecto de la cafeína como antagonista de los receptores para Adenosina A<sub>2A</sub> es bastante reciente y sus propiedades antiparkinsonianas fueron encontradas por serendipia, debido a datos epidemiológicos que muestran que el consumo regular de café (cafeína) reduce el riesgo de padecer la enfermedad de Parkinson (Ravina *et al.* 2003; Fredholm, 2004) y se estima una incidencia aproximada de 30% menos en bebedores de café que en no bebedores (Gale and Martyn, 2003). De este modo se estableció una asociación inversa entre consumo de café y el desarrollo de la enfermedad de Parkinson (Chen *et al.* 2001).

La cafeína ha sido reportada como un estimulante psicomotor que actúa intracelularmente a través de la molécula DARP-32 (Fisone, Borgkvist and Usiello, 2004). Además existen evidencias de que el bloqueo de los receptores Adenosina A<sub>2A</sub> por cafeína puede proteger al paciente de la degeneración relacionada a la enfermedad de Parkinson, en contraste existen pocas evidencias relacionadas al consumo de té posiblemente por tener un consumo menos frecuente a nivel

mundial, al respecto cabe mencionar que la enfermedad de Parkinson, tiene menor incidencia en países como China donde el consumo de té es habitual (Morelli *et al.* 2010).

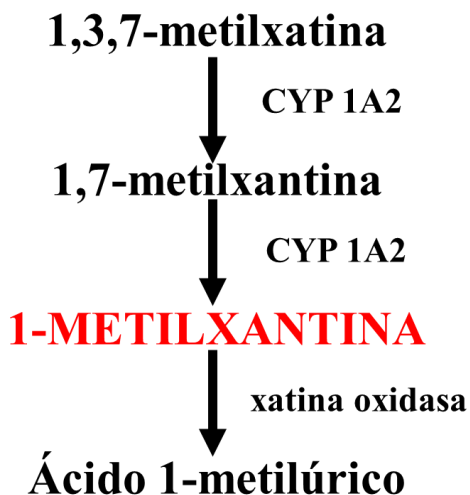
El receptor Adenosina A<sub>2A</sub>, es considerado actualmente como el principal blanco en la terapia no dopaminérgica de la enfermedad de Parkinson. A la fecha existen dos líneas que muestran que la inhibición de los receptores Adenosina A<sub>2A</sub>, son benéficas para el paciente con enfermedad de Parkinson, la primera se basa en que los receptores Adenosina A<sub>2A</sub> y los receptores para Dopamina D<sub>2</sub> co-localizan en la terminal estriatopalidal y muestran un efecto antagónico a nivel molecular, neuroquímico y conductual; la segunda es que los antagonistas de los receptores Adenosina A<sub>2A</sub>, pueden tener un efecto directo atenuando la neurodegeneración dopaminérgica, ya que se ha demostrado un efecto neuroprotector de la cafeína en modelos animales y estudios a largo plazo apoyan una relación inversa entre el consumo de café y el riesgo de padecer la enfermedad de Parkinson (Boison, 2011). De hecho algunas moléculas que son análogos moleculares de las metilxantinas, son antagonistas selectivos del receptor Adenosina A<sub>2A</sub> y en particular destaca la istradefilina ha demostrado una eficacia moderada en el manejo de pacientes con enfermedad de Parkinson (Zelula and Freissmuth, 2008).



## 1-Metilxantina

Después de que la cafeína es ingerida y absorbida en el intestino como 1,3,7-Metilxantina esta molécula es desmetilada 2 veces por la enzima hepática CYP1A2, y convertirla primero en paraxantina (1,7-Metilxantina), la cual también es un antagonista A<sub>2A</sub> inespecífico (Yu, Schwarschild and Chen, 2006), hasta ser convertida en 1-Metilxantina, de este metabolito se excreta un 30% sin cambio en orina y el resto es oxidado por la xantina oxidasa y convertido en ácido 1-metilúrico (Reinke *et al.* 1986) (**Figura 2**).

La 1-Metilxantina, es el metabolito principal de la cafeína y con gran parecido molecular a la



**Figura 2. Biotransformación de la 1,3,7-Metilxantina.**

La enzima hepática CYP 1A2, desmetila dos veces a la cafeína, primero en la posición 3, formando 1,7-Metilxantina (Paraxantina) y después en la posición 7, dando como principal producto a la 1-Metilxantina (en rojo). (Basado en Reinke *et al.* 1986 y Kalow and Tang, 2001)

Adenosina y por lo tanto es posible que tenga capacidad de actuar sobre los receptores para Adenosina, sin embargo es una molécula cuyo efecto aún no ha sido estudiado en los ganglios basales y que además tampoco ha sido citada con relación a la enfermedad de Parkinson.

También se ha reportado información respecto a que la 1-Metilxantina, funciona como antioxidante al captar un oxígeno del medio celular cuando es convertida a 1-metilúrico (Lee, 2000), lo cual podría darle a la 1-

metilxantina un efecto protector ante el estrés oxidativo (Santos *et al.* 2010).

## **Justificación**

Se ha observado que el uso crónico de agonistas dopaminérgicos y la L-DOPA pueden tener un efecto indeseable provocando discinesias en pacientes con enfermedad de Parkinson. Por lo anterior, es muy importante el estudio de alternativas terapéuticas diferentes a L-DOPA, en particular aquellas que actúan a través de receptores no dopaminérgicos.

Como ya fue comentado, los antagonistas de los receptores  $A_{2A}$  han mostrado tener un efecto benéfico en la enfermedad de Parkinson; entre las diversas sustancias que pueden bloquear estos receptores se encuentran las metilxantinas como la cafeína y al parecer sus metabolitos.

El poder contar con un derivado de la cafeína como un coadyuvante en la terapéutica, permitirá reducir la dosis necesaria de L-DOPA y otros agonistas dopaminérgicos y con ello reducirán también las alteraciones motoras y no motoras que estas moléculas pueden producir.

Considerando que la cafeína es una sustancia de empleo mundial y que se ha reportado que su consumo puede tener efecto preventivo de esta enfermedad, se considera importante estudiar el efecto del más importante de sus metabolitos, la 1-Metilxantina; ya que esta molécula es más similar a las purinas endógenas que la cafeína y que posiblemente sea la 1-Metilxantina, la molécula que tenga el efecto más notable sobre los receptores de adenosina y por lo tanto un mayor potencial terapéutico.

## **Hipótesis**

Si las moléculas con núcleo xantínico y con similitud estructural a la cafeína, han mostrado ser una útil herramienta en el manejo farmacológico del paciente con enfermedad de Parkinson, es posible que su principal derivado, la 1-Metilxantina aporte los mismos beneficios terapéuticos en un modelo animal de este padecimiento.

## Metodología y Resultados

### Docking

#### ¿Existe afinidad de la 1-metilxantina por los receptores adenosina A<sub>2A</sub>?

Este experimento fue realizado con el objetivo de conocer de forma predictiva, si la 1-metilxantina presenta afinidad por el receptor adenosina A<sub>2A</sub> y en caso dado compararla con la que muestran la cafeína y la adenosina. Dependiendo la afinidad observada por el receptor Adenosina A<sub>2A</sub> mediante Docking, lograr establecer si esta molécula tendría algún potencial farmacológico. Para ello, se utilizó el programa Autodock3 y la secuencia del receptor Adenosina A<sub>2A</sub> cristalizado del Protein Databank, interactuando con adenosina, cafeína y la 1-metilxantina.

El procedimiento fue el siguiente:

1. Se obtuvo la secuencia del receptor cristalizado del Protein Data Bank en formato pdb.
2. Se procesó la secuencia, se agregaron hidrógenos y se hizo la optimización molecular con el programa swisspdbviewer.
3. Preparación de la molécula por MoleKel para realizar DOCKING por medio del programa AUTODOCK3.
4. Se dibujaron los ligandos (cafeína y 1-metilxantina) por medio del programa isis/draw.
5. Se optimizó la mecánica molecular (MM) básica de los ligandos por medio del programa hiperChem, utilizando el método semiempírico (AM1), para valorar los grados de libertad y agregación de hidrógenos.

6. Por medio del programa Gaussian 98, se realizó la optimización de geometría final, utilizando la herramienta de teoría de funciones de la densidad (B3LYP/6-31G\*\*).

7. Se realizó la conversión del

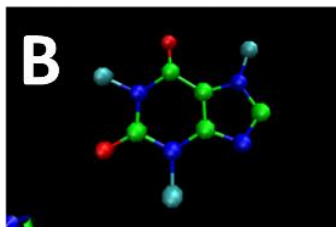
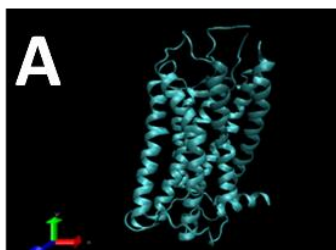
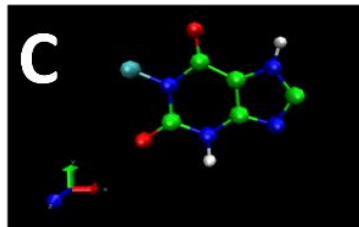


Figura 3. Moléculas listas para ser evaluadas por Docking. Representación en 3D.

A) Receptor Adenosina A<sub>2A</sub>,  
B) Cafeína, y  
C) 1-Metilxantina.



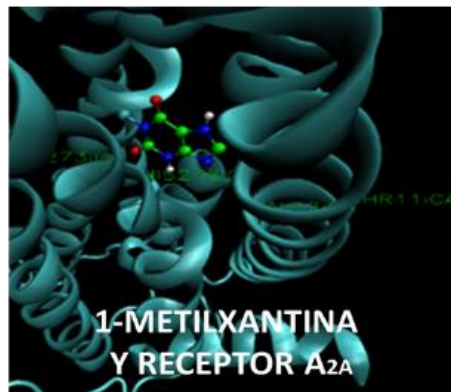
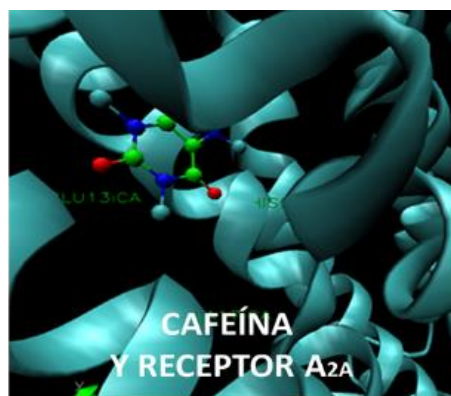
archivo de salida del Gaussian 98 a PDB utilizando el programa MoleKel (**Figura 3**).

8. Los ligandos Interactuaron con el receptor Adenosina A<sub>2A</sub> utilizando el programa AUTODOCK3.

### Resultados

Los resultados de interacción molecular nos indican que la 1-Metilxantina es afín a los receptores Adenosina A<sub>2A</sub> e incluso se une al receptor en los mismos sitios que la cafeína (**Figura 4**).

La afinidad de la 1-Metilxantina por el receptor Adenosina A<sub>2A</sub> fue similar a la que presentó la cafeína, de igual manera se comparó la afinidad de la 1-Metilxantina con la de otras metilxantinas por esta misma estructura, analizando las correspondientes Deltas G de cada una (**Figura 5**).



**Figura 4. Interacción molecular por Docking.**

La cafeína y la 1-Metilxantina se acoplan con los receptores para Adenosina A<sub>2A</sub>, en los mismos sitios.

De acuerdo a los resultados del Docking se observa de forma predictiva, una mayor afinidad de la 1-Metilxantina por el receptor Adenosina A<sub>2A</sub>, con respecto de la que tiene la cafeína por esta estructura, pero aún faltaba demostrar que tuviera algún efecto *in vivo* sobre el receptor y en particular algún efecto evidente sobre la vía estriatopalidal y el sistema de los ganglios basales.

Deltas G (Kcal/mol)	
Adenosina	-7.92
Cafeína	-7.65
1-METILXANTINA	-7.5
Xantina	-7.87
Hipoxantina	-3.95
Theobromina	-7.57
Teofilina	-7.88

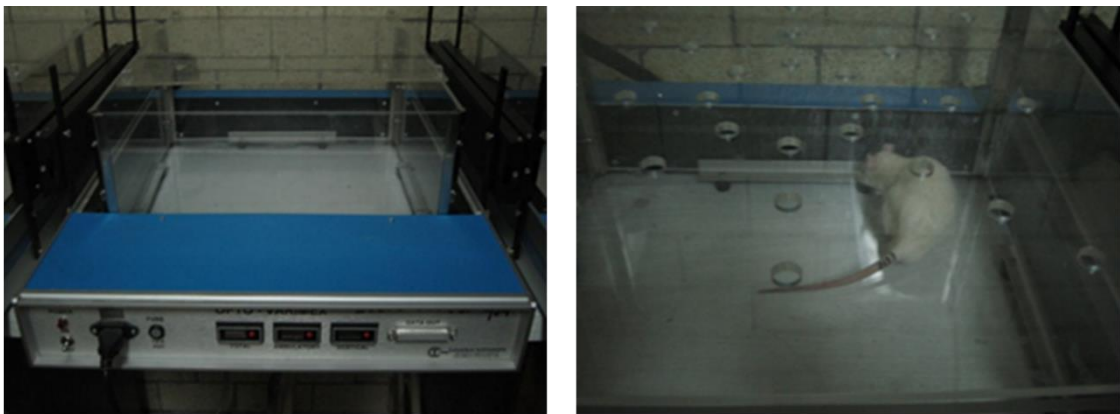
**Figura 5. Deltas G de diferentes moléculas con núcleo xantínico.** A menor Delta G, mayor afinidad por el receptor Adenosina A<sub>2A</sub>.

## Efecto de la 1-Metilxantina sobre la actividad motora libre de la rata

### ¿La 1-Metilxantina favorece la actividad motora libre?

Tomando en cuenta los datos previos sobre la afinidad de la 1-Metilxantina por el receptor Adenosina A<sub>2A</sub> de la terminal estriatopalidal y el respectivo efecto de esta molécula, al modificar la frecuencia de disparo de las neuronas palidales, el paso siguiente fue conocer el efecto de la 1-metilxantina sobre la actividad motora libre de la rata sin lesión cerebral.

Lo anterior con el objetivo de observar el efecto sistémico, en particular si modificaba las conductas motoras de los animales de estudio, utilizando para esto cajas de medición automáticas, de la actividad motora libre (**Figura 6**).



**Figura 6. Cajas para medición de la actividad motora libre.** Estas cajas midieron de forma automática el desplazamiento horizontal, la actividad vertical y calcularon la actividad motora total, lo que permitió conocer el efecto de la 1-Metilxantina *versus* Cafeína sobre la actividad motora libre de la rata.

Para este experimento, se utilizaron 18 ratas Wistar Macho (200gm  $\pm$ 10gm) las cuales fueron divididas en 3 grupos (n=6, por cada grupo), al primero (CONTROL) se le inyectó solución salina (NaCl 0.9%, I.P.), al segundo 1-Metilxantina (7.5mg/kg, vía I.P.), al tercero se le inyectó Cafeína (7.5mg/Kg, vía I.P.).

Después de la inyección I.P. se dio una latencia de 10 minutos y se procedió a evaluar durante 5 minutos en cuarto oscuro y sin ruidos.

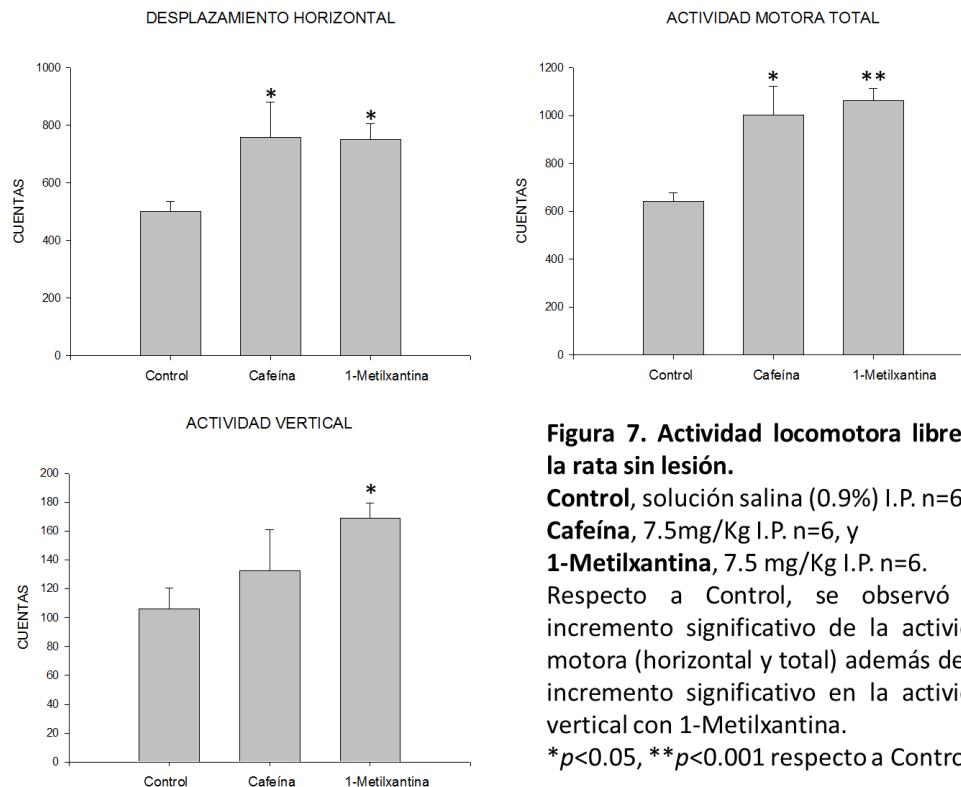
Se midió:

- Desplazamiento horizontal,
- Actividad vertical
- Actividad motora total (fue calculada automáticamente por el equipo)

El promedio y el error estándar de cada grupo, fue analizado mediante Sigma Stat 3.2, utilizando t-student y ANOVA de una vía (con Newman –Keuls *post-hoc* test), a fin de evaluar si hubo diferencias significativas, entre los grupos.

Los resultados obtenidos mostraron que tanto la cafeína como la 1-Metilxantina incrementaron significativamente la actividad motora libre de la rata sin lesión, comparando con el grupo control que solo recibió solución salina I.P. (NaCl 0.9%). (**Figura 7**).

Derivada de los resultados, surgió la pregunta sobre si este efecto observado sobre la rata sin lesión fue verdaderamente sobre la actividad motora o fue secundario a la inducción de un estado ansioso en la rata, por la 1-Metilxantina.



**Figura 7. Actividad locomotora libre en la rata sin lesión.**

**Control**, solución salina (0.9%) I.P. n=6,

**Cafeína**, 7.5mg/Kg I.P. n=6, y

**1-Metilxantina**, 7.5 mg/Kg I.P. n=6.

Respecto a Control, se observó un incremento significativo de la actividad motora (horizontal y total) además de un incremento significativo en la actividad vertical con 1-Metilxantina.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$  respecto a Control.



## Estudio del efecto ansiogénico de la 1-Metilxantina.

### ¿Tiene la 1-Metilxantina un efecto ansiogénico?

Para poder discernir si los resultados observado en la actividad motora libre era debido a la ansiedad o exclusivamente sobre la actividad motora se decidió utilizar el modelo de conducta de enterramiento (Burying behavior) para evaluar el posible efecto ansiogénico de la 1-Metilxantina, comparando nuevamente con Cafeína (**Figura 8**).



**Figura 8. Modelo de conducta de enterramiento (Burying behavior).**

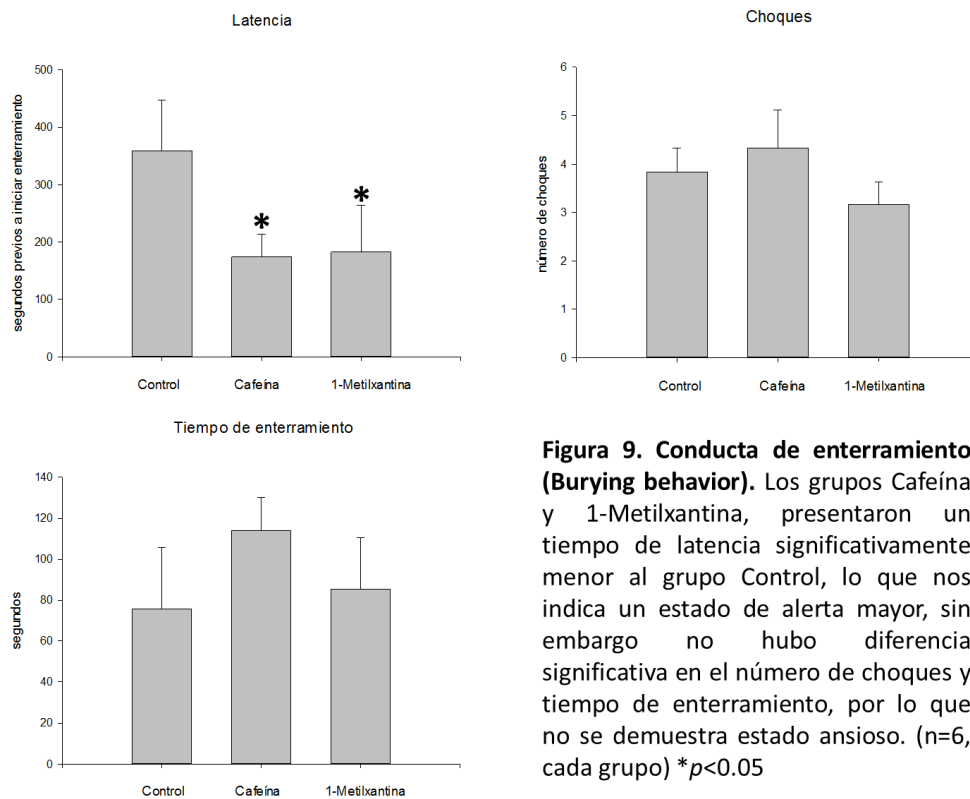
Con el fin de evaluar efectos ansiogénicos o ansiolíticos de diferentes fármacos, la rata es colocada en estos contenedores, donde la rata está en contacto con un electrodo que le proporciona descargas eléctricas al tocarlo, se evalúa la ansiedad del animal, tomando en cuenta: **Latencia, Número de choques y Tiempo de enterramiento.**

Para este experimento se utilizaron ratas Wistar macho ( $300 \pm 10$ g,  $n=18$ ); se mantuvo a los animales en habituación durante por lo menos 15 días, en un cuarto aislado de ruidos y con ciclo luz/oscuridad controlado de 12h c/u, agua y comida ad libitum.

Tres días previos al estudio se aisló a las ratas en cajas individuales. El día del estudio las ratas fueron colocadas en el cuarto de registro con luz roja, por lo menos 2 horas antes de iniciar, para lograr una habituación al medio y reducir al mínimo el estrés.

Se estudiaron 3 grupos: Grupo Control( $n=6$ ) (vehículo, NaCl 0.9%+NaHCO<sub>3</sub> 0.08%) I.P., Grupo B ( $n=6$ ) Cafeína (7.5mg/kg disuelto en vehículo) I.P. y Grupo C ( $n=6$ ) 1-Metilxantina (7.5mg/kg disuelto en vehículo) I.P.

Al igual que en el estudio sobre actividad motora, se dio un periodo de 10 minutos desde la inyección I.P. hasta el inicio de la prueba, la cual tuvo una duración de 10 minutos por cada rata. Se evaluaron tres aspectos: **LATENCIA** (el tiempo que tarda la rata en iniciar la conducta de enterramiento después del primer choque eléctrico), **CHOQUES** (el número total de choques durante la prueba) y **TIEMPO DE ENTERRAMIENTO** (el total de segundos que pasó la rata enterrando con aserrín el electrodo) (**Figura 9**).



**Figura 9. Conducta de enterramiento (Burying behavior).** Los grupos Cafeína y 1-Metilxantina, presentaron un tiempo de latencia significativamente menor al grupo Control, lo que nos indica un estado de alerta mayor, sin embargo no hubo diferencia significativa en el número de choques y tiempo de enterramiento, por lo que no se demuestra estado ansioso. (n=6, cada grupo) \* $p < 0.05$

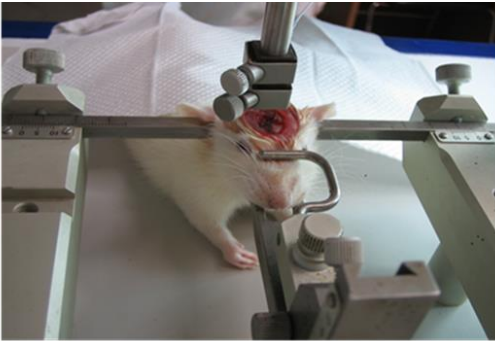
Los resultados mostraron que la 1-Metilxantina a la misma dosis que la Cafeína (7.5mg/Kg), no induce un estado ansioso en la rata (ya que no hubo diferencia significativa entre los grupos, en cuanto a número de choques y tiempo de enterramiento), pero mantiene a la rata en un estado de alerta mayor, según se observa en la reducción de la Latencia.

Lo restante fue determinar si la 1-Metilxantina mostraba efecto sobre la conducta de giro inducido por apomorfina en ratas con lesión intracerebral por 6-OHDA.

## Modelo animal de la enfermedad de Parkinson

Finalmente después de tener evidencia de que la 1-Metilxantina presenta afinidad por los receptores Adenosina  $A_{2A}$ , que muestra además un efecto antagónico al de la adenosina en la terminal estriatopalidal, y con efectos positivos sobre la actividad motora libre de la rata, sin que sea debido a ansiedad; se procedió a realizar experimentos en el modelo animal de giro inducido por apomorfina en ratas con inyección intracerebral de 6-OHDA en el haz medial del cerebro anterior (**Figura 10**).

Lo anterior se basa en el hecho de que las zonas con denervación dopaminérgica tienen un incremento en la densidad de receptores a dopamina y que la estimulación de los mismos por agonistas dopaminérgicos, fármacos antiparkinsonianos o la combinación de ambos, genera giro



**Figura 10. Lesión del haz medial del cerebro anterior (mfb) con 6-OHDA y modelo de giro inducido por apomorfina.**

Es uno de los modelos más utilizados para evaluar el potencial antiparkinsoniano de diferentes fármacos.

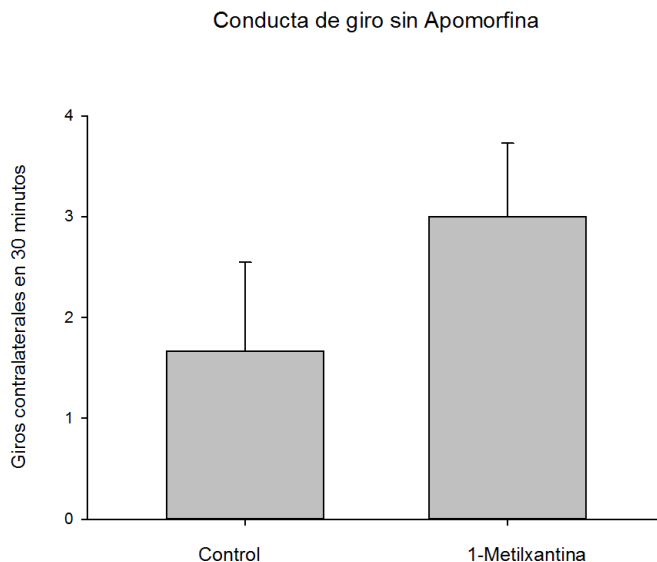
contralateral.

Para este experimento se utilizaron 27 Ratas Wistar macho ( $200g \pm 10$ ), se realizaron dos estudios, **Sin Apomorfina (n=9)** divididas en 2 grupos: Grupo Control (3 ratas) y Grupo 1-Metilxantina (6 ratas) y **Con Apomorfina (n=18)**, divididas en grupos de 6 ratas cada uno: CONTROL, CAFEINA Y 1-METILXANTINA.

Todas las ratas recibieron inyección intracerebral de 6-OHDA (concentración  $16\mu g/\mu l$ , volumen  $1\mu l$ ) en el haz medial (mfb) del lado derecho (AP-0.9, Lat. +3.0 y Prof. -5.2). (Paxinos y Watson, 2013).

### Conducta de Giro sin Apomorfina

En esta parte del estudio y al séptimo día de la cirugía y con la intención de conocer si la 1-Metilxantina (7.5mg/Kg I.P.) producía giro contralateral en la rata con lesión unilateral sin Apomorfina, se comparó contra el grupo Control (NaCl 0.9%+NaHCO3 0.08%) **Figura 11.**



**Figura 11. Giros contralaterales sin Apomorfina.**

La inyección intraperitoneal de 1-Metilxantina (n=6), no produjo una diferencia significativa en cuanto a los giros contralaterales, respecto al grupo Control (n=3), (NaCl 0.9%+NaHCO3 0.08%).

$p=1.59$

Los resultados obtenidos al estudiar la conducta de giro sin apomorfina, no mostraron una diferencia significativa ( $p=1.59$ , student *t*-test) en el número de giros contralaterales que dieron las ratas que recibieron 1-Metilxantina en comparación a las que recibieron sólo vehículo.

### **Conducta de Giro con Apomorfina**

Al segundo día de la cirugía se evaluó la denervación dopaminérgica por medio de inyección subcutánea de apomorfina (0.5mg/Kg), el cual es un fármaco agonista dopaminérgico preferente D<sub>2</sub>, sólo se consideraron para los experimentos, las ratas que presentaron más de 200 giros contralaterales en media hora.

Se evaluó el giro inducido por apomorfina en combinación con Cafeína y 1-Metilxantina, a los 7, 15 y 30 días después de la lesión con el fin de evitar habituación a los fármacos, se administraron sólo el día que los grupos serían evaluados.

Los grupos de estudio fueron:

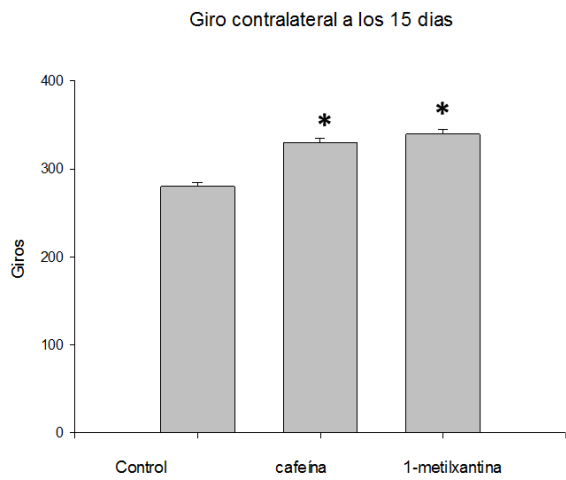
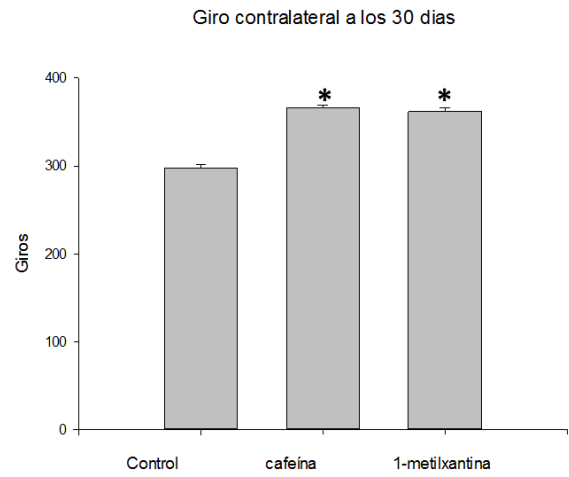
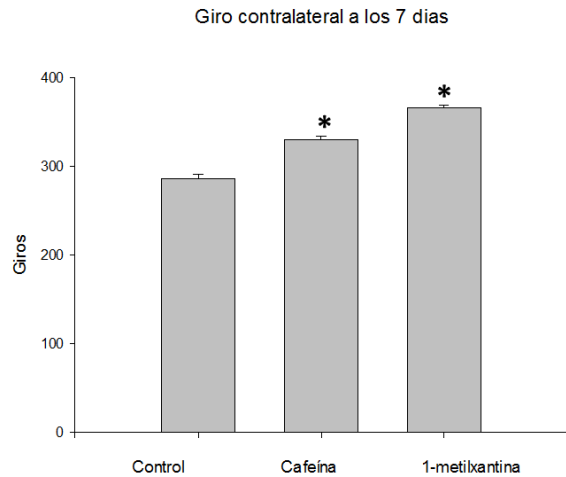
Grupo CONTROL (n=10) se administra vehículo (NaCl 0.9%+NaHCO<sub>3</sub> 0.08%) I.P.

Grupo CAFEINA (n=10) (7.5mg/kg disuelto en vehículo) I.P.

Grupo 1-METILXANTINA (n=10) (7.5mg/kg disuelto en vehículo) I.P.

### **Resultados**

Los resultados mostraron que posterior a la inyección de apomorfina, los giros que dieron las ratas tratadas con cafeína y las que recibieron 1-Metilxantina, fueron significativamente mayores que los que tuvieron las ratas del grupo Control, las cuales solo recibieron vehículo (NaCl 0.9%+NaHCO<sub>3</sub> 0.08%). No obstante, no se observó alguna diferencia significativa entre los grupos cafeína y 1-Metilxantina, por lo que no podríamos afirmar que esta molécula tenga un efecto mucho mayor que la cafeína como Antagonista de los receptores Adenosina A<sub>2A</sub> y en particular como agente antiparkinsoniano (**Figura 12**).



**Figura 12. Modelo de giro inducido por apomorfina en rata con lesión unilateral del haz medial con 6-OHDA.** La 1-Metilxantina y la Cafeína, mostraron un incremento significativo en el número de giros respecto a Control. Sin embargo el efecto antiparkinsoniano de la 1-Metilxantina no es significativamente mayor al que mostró la Cafeína. (n=30, cada grupo) \* $p < 0.05$

## Discusión

### **Docking: afinidad de la 1-Metilxantina por el receptor Adenosina A<sub>2A</sub>**

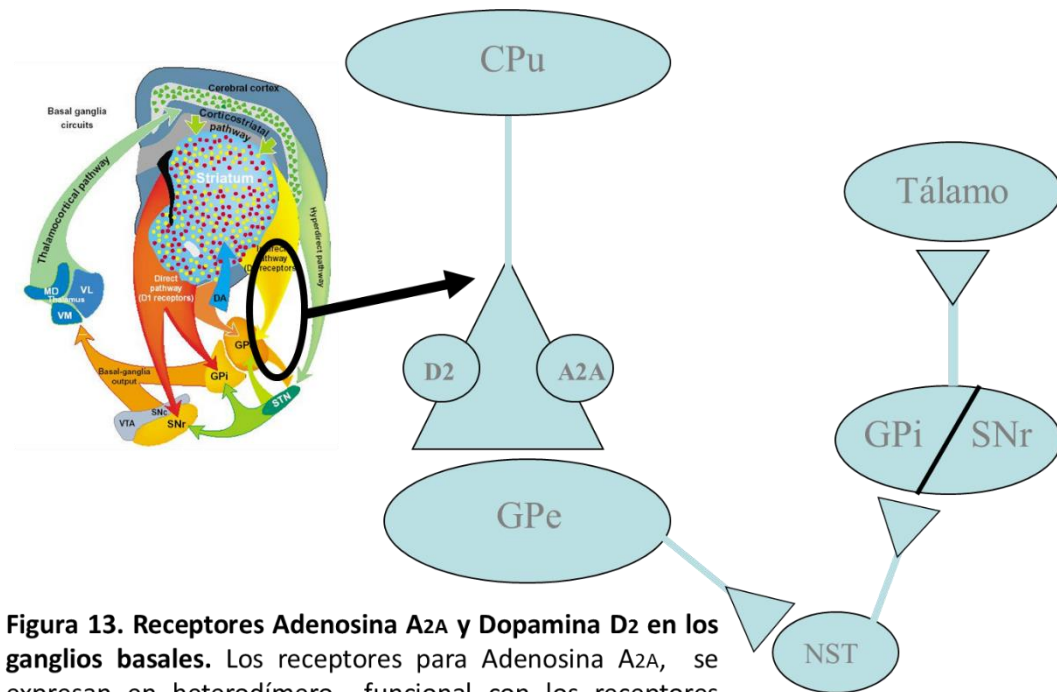
En nuestro estudio, la 1-Metilxantina, el principal derivado de la cafeína y que presentó al igual que su molécula de origen, un núcleo xantínico como estructura base (“**xantinic core**”)\*, también demostró afinidad similar y discretamente mayor a la que tuvo la cafeína por el receptor Adenosina A<sub>2A</sub>.

Cabe hacer mención que dentro de las opciones terapéuticas para la enfermedad de Parkinson, existe la istradefilina la cual es también una molécula con núcleo xantínico, esta similitud estructural entre ambas moléculas y en particular sus efectos antiparkinsonianos reportados (Zelula y Freissmuth, 2008), alientan fuertemente nuestros resultados de Docking con relación al potencial terapéutico de la 1-Metilxantina.

En nuestro caso de estudio el hecho que no haya reportes previos sobre la afinidad de la 1-Metilxantina por los receptores adenosina A<sub>2A</sub> es algo bastante alentador, ya que abre una gama de posibilidades de estudio sobre esta molécula derivada directamente de la cafeína y que es el principal producto de su biotransformación.

**\*Ver Apendice A. Artículo: Homology modeling, molecular dynamics and docking simulations of rat A<sub>2A</sub> receptor: A three-dimensional model validation under QSAR studies.**

Los receptores Adenosina A<sub>2A</sub>, se localizan principalmente en los ganglios basales y de hecho, la modulación de estos receptores por antagonistas A<sub>2A</sub> produce efectos significativos de la función motora, esto debido a la interacción con los receptores D<sub>2</sub>, con los cuales se coexpresa en la terminal estriatopalidal y con los que se relaciona intracelularmente (Kase, 2001) **Figura 13.**



**Figura 13. Receptores Adenosina A<sub>2A</sub> y Dopamina D<sub>2</sub> en los ganglios basales.** Los receptores para Adenosina A<sub>2A</sub>, se expresan en heterodímero funcional con los receptores Dopamina D<sub>2</sub>, en la terminal estriatopalidal de la vía indirecta. (Basado en Fredholm and Svenningsson, 2003)

Por lo tanto, los receptores Adenosina A<sub>2A</sub> y los heterómeros relacionados a estos receptores, son importantes moduladores de la neurotransmisión estriatal, donde también regulan la actividad dopaminérgica sobre los ganglios basales (Armentero *et al.* 2011).

Es importante recordar que la zona de la terminal estriatopalidal donde se expresan más complejos heteroméricos A<sub>2A</sub>-D<sub>2</sub>, es la que se localiza en el anillo perisináptico, el cual se encuentra adyacente a la densidad postsináptica de las sinapsis glutamatérgicas sobre las espinas dendríticas de las neuronas GABAérgicas y que este heterodímero también puede modular el potencial de membrana de las neuronas estriatales y en consecuencia su excitabilidad (Schiffmann, 2007).

Otro dato importante a tomar en cuenta es que los receptores Adenosina A<sub>2A</sub> y los Dopamina D<sub>2</sub> tienen un efecto opuesto en la liberación de GABA en el estriado y el globo pálido, de hecho está demostrado que en efecto de inhibición en la liberación GABA mediada por el receptor D<sub>2</sub>, es



bloqueado por la estimulación del receptor Adenosina A<sub>2A</sub>, lo cual permite afirmar que el sistema eferente estriatopallidal es modulado por la interacción A<sub>2A</sub>/D<sub>2</sub> (Mayfield *et al.* 1996).

Apoiando lo anterior, debemos considerar que los receptores Adenosina A<sub>2A</sub> también tienen una importante relación heteromérica con los receptores glutamatérgicos mGlu5, con los cuales sinergizan a nivel de las neuronas GABAérgicas estriatopallidales dorsales y lo cual podría explicar el efecto benéfico que han mostrado los antagonistas A<sub>2A</sub> en modelos de ratas reserpinizadas (Fuxe *et al.* 2010).

Por lo anterior, debemos tener en cuenta que el camino a la comprensión de estas interacciones funcionales entre receptores acoplados a proteínas G, rompe los paradigmas que consideraban que estas estructuras no requerían oligomerizarse, sin embargo a la fecha podemos hablar de una interacción oligomérica entre los receptores A<sub>2A</sub>-CB1-D<sub>2</sub> y A<sub>2A</sub>-D<sub>2</sub>-mGlu5 (Ferré and Franco, 2010), misma que ya se ha demostrado por diferentes técnicas y que permite una impredecible regulación alostérica receptor-receptor y que incluso podrían estar relacionadas en el control de la transmisión corticoestriatal (Ciruela *et al.* 2012), incluso abre la puerta al estudio de fármacos que modulen al receptor Adenosina A<sub>2A</sub> y al mGlu5 para el manejo del paciente con enfermedad de Parkinson (Ferraro *et al.* 2012)

### **Conducta de giro inducido**

Cuando el núcleo caudado-putamen del paciente con enfermedad de Parkinson, está completamente depletado de dopamina, los antagonistas de los receptores Adenosina A<sub>2A</sub> pueden modular el balance de salida de la terminal estriato pallidal y de esta forma aliviar síntomas parkinsonianos, al prevenir la actividad excesiva de las neuronas estriatopallidales. (Bargiostas y Konitsiotis, 2013)

Se ha demostrado también que existen complejos heteroméricos entre los receptores Adenosina A<sub>2A</sub> y los receptores para glutamato mGlu5, lo cual resulta interesante debido a que esta interacción

sucede principalmente en la vía estriatopalidal, lo cual podría explicar el efecto positivo del uso crónico de los antagonistas de receptores mGlu5 en modelos animales de Parkinson (Agnati *et al.* 2003). Otra importante interacción del receptor de Adenosina A<sub>2A</sub> a través de heterómeros, es con el receptor para cannabinoides CB<sub>1</sub>, lo cual modula también la liberación de GABA en la terminal estriatopalidal y es posible que los tres receptores A<sub>2A</sub>, D<sub>2</sub> y CB<sub>1</sub> formen parte del mismo heterómero (Ferré *et al.* 2009).

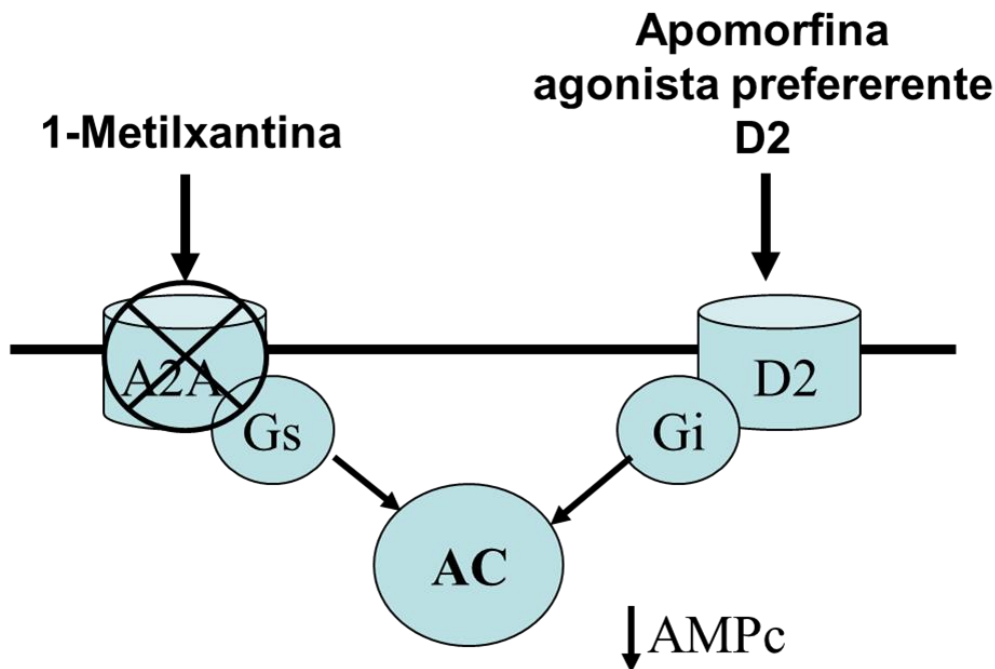
La mayoría de los efectos de la adenosina en el sistema nervioso central depende de los receptores Adenosina A<sub>1</sub> y A<sub>2A</sub>, e incluso estos receptores pueden modular algunos de los efectos farmacológicos de ciertos cannabinoides, en particular de aquellos que modifican la función estriatal (Ferré *et al.* 2010 a), esto a través de la integración sináptica de los receptores Adenosina A<sub>2A</sub> y CB<sub>1</sub>, de hecho el efecto de la activación de los receptores Adenosina A<sub>2A</sub> requiere participación de los CB<sub>1</sub>, ya al parecer depende del estado del heteromero A<sub>2A</sub>/CB<sub>1</sub> (Tebano, Martire and Popoli, 2012).

Nuestros resultados indican que la 1-Metilxantina podría tener un discreto potencial como antiparkinsoniano, ya que el efecto observado fue ligeramente superior a la cafeína y significativamente mayor a la que mostró el grupo control, lo que nos indica que el efecto fue el esperado para esta molécula al potenciar el giro contralateral inducido por apomorfina esto posiblemente como respuesta al bloqueo del receptor Adenosina A<sub>2A</sub> de la terminal estriatopalidal **(Figura 14)**.

Es importante recordar que los fármacos que presentan efecto antiparkinsoniano potencian el giro contralateral inducido por apomorfina en ratas lesionadas con 6-OHDA, bien se trate de los que actúan como agonistas de los receptores para Dopamina D<sub>2</sub>, como el pramipexol (Mierau and Schignitz, 1992) y ropirinol el cual tiene actividad sobre los receptores Dopamina D<sub>2</sub> y también D<sub>3</sub> (Matsukawa *et al.* 2007).

Con relación a nuestro caso de estudio, uno de los antagonistas de los receptores Adenosina A<sub>2A</sub> mas estudiados es la istradefilina, una molécula con núcleo xantínico al igual que la cafeína y la 1-Metilxantina. De hecho la istradefilina (E)-1,3-diethyl-8-(3,4-dimethoxystyryl)-7-methylxanthine, conocido experimentalmente como KW-6002, ha demostrado potenciar los beneficios de una dosis de L-DOPA reducida, en pacientes con enfermedad de Parkinson avanzada, además de presentar un notable efecto discinético (Petzer *et al.* 2009).

La istradefilina también potencia el giro contralateral inducido por apomorfina, en el modelo de ratas con lesión por 6-OHDA, además de atenuar los movimientos involuntarios anormales en modelos animales de la enfermedad de Parkinson (Spinnewyn *et al.* 2011).



**Figura 14. Interacción de la 1-Metilxantina con la Apomorfina.** Al producirse un bloqueo del receptor Adenosina A<sub>2A</sub> en la terminal estriato palidal, el efecto de la Apomorfina sobre la conducta de giro inducido contralateral a la lesión con 6-OHDA es potenciado. (Basado en Fredholm and Svenningsson, 2003)

## **Conclusión**

De acuerdo a los resultados obtenidos, al parecer la 1-Metilxantina es una molécula con un potencial discreto para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, sin embargo no se observa que tenga un efecto mucho más potente que la cafeína. Lo que nos indica que no podría proponerse a la 1-metilxantina como una monoterapia para el manejo del paciente, sin embargo podría complementar el tratamiento farmacológico asociado a L-DOPA, logrando una disminución de la dosis y con ello una reducción de los efectos adversos relacionados a esta molécula.

Lo más significativo de nuestro trabajo es que la 1-Metilxantina no ha sido considerada como una molécula con actividad farmacológica, no obstante ha presentado un efecto discreto como antagonista de los receptores Adenosina  $A_{2A}$ , mismo que podría abrir la puerta a mayores estudios relacionados a la misma y podría ser evaluada con relación a su potencial farmacológico en otras patologías y no solamente en el manejo del paciente con enfermedad de Parkinson.

## Referencias

- Aarsland D, Ballard CG, Halliday G. Are Parkinson's disease with dementia and dementia with Lewy bodies the same entity? *J.Geriatr.Psychiatry Neurol.* 2004 Sep;17(3):137-145.
- Agnati LF, Leo G, Vergoni AV, Martinez E, Hockemeyer J, Lluís C, et al. Neuroprotective effect of L-DOPA co-administered with the adenosine A2A receptor agonist CGS 21680 in an animal model of Parkinson's disease. *Brain Res.Bull.* 2004 Aug 30;64(2):155-164.
- Agnati, L.F., Ferre, S., Lluís, C., Franco, R. and Fuxe, K. Molecular mechanisms and therapeutical implications of intramembrane receptor/receptor interactions among heptahelical receptors with examples from the striatopallidal GABA neurons. *Pharmacological Reviews.* 55 (2003) 509-550.
- Aoyama S, Kase H, Borrelli E. Rescue of locomotor impairment in dopamine D2 receptor-deficient mice by an adenosine A2A receptor antagonist. *J.Neurosci.* 2000 Aug 1;20(15):5848-5852.
- Armentero, M.T., Pinna, A., Ferre, S., Lanciego, J.L., Muller, C.E. and Franco, R. Past, present and future of A2A adenosine receptor antagonists in the therapy of Parkinson's disease. *Pharmacology and Therapeutics.* 132(3) (2011) 280-299.
- Ashour R, Tintner R, Jankovic J. Striatal deformities of the hand and foot in Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2005 Jul;4(7):423-431.
- Ballard CG. Definition and diagnosis of dementia with Lewy bodies. *Dement.Geriatr.Cogn.Disord.* 2004;17 Suppl 1:15-24.
- Bara-Jimenez W, Sherzai A, Dimitrova T, Favit A, Bibbiani F, Gillespie M, et al. Adenosine A(2A) receptor antagonist treatment of Parkinson's disease. *Neurology* 2003 Aug 12;61(3):293-296.

- Bara-Jimenez, W., Sherzai, A., Dimitrova, T., Bibbiani, F., Gillespie, M., Morris, M.J., Mouradian, M.M. and Chase, T.N. Adenosine A(2A) receptor antagonist treatment of Parkinson's disease. *Neurology* 61:3 (2003) 293-296.
- Bargiotas, P and Konitsiotis, S. Levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease: emerging treatments. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 9 (2013) 1605-1617.
- Barone P, Amboni M, Vitale C, Bonavita V. Treatment of nocturnal disturbances and excessive daytime sleepiness in Parkinson's disease. *Neurology* 2004 Oct 26;63(8 Suppl 3):S35-8.
- Benabid AL. Deep brain stimulation for Parkinson's disease. *Curr.Opin.Neurobiol*. 2003 Dec;13(6):696-706.
- Bhat V, Weiner WJ. Parkinson's disease. Diagnosis and the initiation of therapy. *Minerva Med*. 2005 Jun;96(3):145-154.
- Blandini, F. Adenosine receptors and L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease: potential targets for a new therapeutic approach. *Exp. Neurol*. 184:2 (2003) 679-687.
- Boeve BF, Silber MH, Ferman TJ. REM sleep behavior disorder in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *J.Geriatr.Psychiatry Neurol*. 2004 Sep;17(3):146-157.
- Boison, D. Modulators of nucleoside metabolism in the therapy of brain diseases. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 11(8) (2011) 1068-1086.
- Bosboom JL, Stoffers D, Wolters EC. Cognitive dysfunction and dementia in Parkinson's disease. *J.Neural Transm*. 2004 Oct;111(10-11):1303-1315.
- Bosboom JL, Wolters EC. Psychotic symptoms in Parkinson's disease: pathophysiology and management. *Expert Opin.Drug Saf*. 2004 May;3(3):209-220.

- Bove J, Marin C, Bonastre M, Tolosa E. Adenosine A2A antagonism reverses levodopa-induced motor alterations in hemiparkinsonian rats. *Synapse* 2002 Dec 15;46(4):251-257.
- Brachtel, D. and Richter, E. (1992) Absolute bioavailability of caffeine from a tablet formulation. *Journal Hepatology* 16: 385.
- Burn DJ, McKeith IG. Current treatment of dementia with Lewy bodies and dementia associated with Parkinson's disease. *Mov.Disord.* 2003 Sep;18 Suppl 6:S72-9.
- Busto, U., Bendayan, R. and Sellers, E.M. (1989) Clinical Pharmacokinetics of non-opiate abused drugs. *Clinical Pharmacokinetic Therapy* 16, 1-26.
- Chase TN, Engber TM, Mouradian MM. Palliative and prophylactic benefits of continuously administered dopaminomimetics in Parkinson's disease. *Neurology* 1994 Jul;44(7 Suppl 6):S15-8.
- Chaudhuri KR, Healy DG, Schapira AH, National Institute for Clinical Excellence. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol.* 2006 Mar;5(3):235-245.
- Chaudhuri KR, Yates L, Martinez-Martin P. The non-motor symptom complex of Parkinson's disease: a comprehensive assessment is essential. *Curr.Neurol.Neurosci.Rep.* 2005 Jul;5(4):275-283.
- Chen JF, Xu K, Petzer JP, Staal R, Xu YH, Beilstein M, et al. Neuroprotection by caffeine and A(2A) adenosine receptor inactivation in a model of Parkinson's disease. *J.Neurosci.* 2001 May 15;21(10):RC143.
- Chen JF. The adenosine A(2A) receptor as an attractive target for Parkinson's disease treatment. *Drug News.Perspect.* 2003 Nov;16(9):597-604.

- Chen LW, Yung KK, Chan YS. Neurokinin peptides and neurokinin receptors as potential therapeutic intervention targets of basal ganglia in the prevention and treatment of Parkinson's disease. *Curr. Drug Targets* 2004 Feb;5(2):197-206.
- Chen, J.F. The adenosine A(2A) receptor as an attractive target for Parkinson's disease treatment. *Drug News Perspect.* 16:9 (2003) 597-604.
- Chen, J.F., Xu, K., Petzer, J., Staal, R., Xu, Y., Beilstein, M., Sonsalla, P.K., Castagnoli, K., Castagnoli, N. and Schwarzschild, M.A. Neuroprotection by caffeine and A2A adenosine receptor inactivation in a model of Parkinson disease. *The journal of neuroscience.* 21 (2001) 1-6.
- Ciruela F, Fernández-Dueñas V, Llorente J, Borroto-Escuela D, Cuffí ML, Carbonell L, Sánchez S, Agnati LF, Fuxe K and Tasca CI. G protein-coupled receptor oligomerization and brain integration: focus on adenosinergic transmission. *Brain Res.* 2012 Oct 2;1476:86-95.
- Collins B, Constant J, Kaba S, Barclay CL, Mohr E. Dementia with lewy bodies: implications for clinical trials. *Clin. Neuropharmacol.* 2004 Nov-Dec;27(6):281-292.
- Crossman, A.R. Functional anatomy of movement disorders. *Journal of Anatomy.* 196 (2000) 519-525.
- Daly, J.W. and Fredholm, B.B. Caffeine an atypical drug of dependence. *Drug and alcohol dependence* 51 (1998) 199-206.
- De Letter M, Santens P, De Bodt M, Boon P, Van Borsel J. Levodopa-induced alterations in speech rate in advanced Parkinson's disease. *Acta Neurol. Belg.* 2006 Mar;106(1):19-22.
- Dixon AK, Gubitz AK, Sirinathsinghji DJ, Richardson PJ, Freeman TC. Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *Br J Pharmacol.* 1996 Jul;118(6):1461-1468.



- Evans AH, Lees AJ. Dopamine dysregulation syndrome in Parkinson's disease. *Curr.Opin.Neurol.* 2004 Aug;17(4):393-398.
- Fernandez HH, Wu CK, Ott BR. Pharmacotherapy of dementia with Lewy bodies. *Expert Opin.Pharmacother.* 2003 Nov;4(11):2027-2037.
- Ferraro L, Beggiato S, Tomasini MC, Fuxe K, Antonelli T, Tanganelli S. A(2A)/D(2) receptor heteromerization in a model of Parkinson's disease. Focus on striatal aminoacidergic signaling. *Brain Res.* 2012 Oct 2; 1476: 96-107.
- Ferre, S., Ciruela, F., Quiroz, C., Lujan, R., Popoli, P., Cunha, R.A., Agnati, L.F., Fuxe, K., Woods, A.S., Lluis, C. and Franco, R. Adenosine receptor heteromer and their integrative role in striatal function. *The Scientific World Journal.* 7(S2) (2007) 74-85.
- Ferre, S., Goldberg, S.R., Lluis, C. and Franco, R. Looking for the roler of cannabinoid receptor heteromers in striatal function. *Neuropharmacology.* 56(suppl 1) (2009) 226-234.
- Ferre, S., Lluis, C., Justinova, Z., Quiroz, C., Orru, M., Navarro, G., Canela, E., Franco, R. and Goldberg S.R. Adenosine-cannabinoid receptor interactions. Implications for striatal function. *British Journal of Pharmacology.* 160 (2010) 443-453.
- Ferré S and Franco R. Oligomerization of G-protein-coupled receptors: a reality. *Curr Opin Pharmacol.* 2010 Feb;10(1):1-5.
- Ferre, S., Quiroz, C., Woods, A.S., Popoli, P., Ciruela, F., Lluis, R., Franco, R., Azdad, K. and Schiffmann, S.N. An update on adenosine A2A-Dopamine D2 receptor interactions. Implications for the function of G protein-coupled receptors. *Current Pharmaceutical Design.* 14(15) (2008) 1468-1474.

- Ferre, S., Woods, A.S., Navarro, G., Aymerich, M., Lluís, C. and Franco, R. Calcium-mediated modulation of the quaternary structure and function of adenosine A2A-Dopamine D2 receptor heteromers. *Current Opinion in Pharmacology*. 10(1) (2010) 67-72.
- Fisone G, Borgkvist A, Usiello A. Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *Cell Mol.Life Sci*. 2004 Apr;61(7-8):857-872.
- Fisone, G., Borgkvist, A. and Usiello, A. Caffeine as a psicomotor stimulant: mechanism of action. *Cell Mol. Life Sci*. 61:7-8 (2004) 857-872.
- Fredholm BB. Connection between caffeine, adenosine receptors and dopamine. Coffee reduces the risk of Parkinson disease. *Lakartidningen* 2004 Aug 19;101(34):2552-2555.
- Fredholm, B. B., Ijserman, A. P., Jacobson, K. A. Klotz, K. and Linden, J. International Union of pharmacology. XXV. Nomenclatura and classification of adenosine receptors. *Pharmacological reviews*. 53(4) (2001) 527-552.
- Fredholm, B. B., Ijserman, A. P., Jacobson, K. A. Klotz, K. and Linden, J. International Union of pharmacology. XXV. Nomenclatura and classification of adenosine receptors. *Pharmacological reviews*. 53(4) (2001) 527-552.
- Fredholm, B.B. and Svenningsson, P. Adenosine-dopamine interactions:development of a concept and some comments on therapeutics possibilities. *Neurology* 61 (11 suppl. 6) (2002) s5-s9.
- Frucht SJ. Parkinson disease: an update. *Neurologist* 2004 Jul;10(4):185-194.
- Fuchs GA, Gemende I, Herting B, Lemke MR, Oehlwein C, Reichmann H, et al. Dementia in idiopathic Parkinson's syndrome. *J.Neurol*. 2004 Sep;251 Suppl 6:VI/28-32.

- Fuxe K, Marcellino D, Leo G and Agnati LF. Molecular integration via allosteric interactions in receptor heteromers. A working hypothesis. *Curr Opin Pharmacol.* 2010 Feb;10(1):14-22.
- Gale C, Martyn C. Tobacco, coffee, and Parkinson's disease. *BMJ* 2003 Mar 15;326(7389):561-562.
- Gao, Z., Kim, S., IJzerman, A.P. and Jacobson, K.A. Allosteric modulation of the adenosine family of receptors. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry.* 5(6) (2005) 545-553.
- Garrett BE, Holtzman SG. Does adenosine receptor blockade mediate caffeine-induced rotational behavior? *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1995 Jul;274(1):207-214.
- Geser F, Wenning GK, Poewe W, McKeith I. How to diagnose dementia with Lewy bodies: state of the art. *Mov.Disord.* 2005 Aug;20 Suppl 12:S11-20.
- Giasson BI, Lee VM. Are ubiquitination pathways central to Parkinson's disease? *Cell* 2003 Jul 11;114(1):1-8.
- Grondin R, Bedard PJ, Hadj Tahar A, Gregoire L, Mori A, Kase H. Antiparkinsonian effect of a new selective adenosine A2A receptor antagonist in MPTP-treated monkeys. *Neurology* 1999 May 12;52(8):1673-1677.
- Grondin, R., Bedard, P.J., Hadj Tahar, A., Gregoire, L., Mori, A. and Kase, H. Antiparkinsonian effect of a new selective A2A receptor antagonist in MPTP-treated monkeys. *Neurology* 52 (1999) 1673-1677.
- Hanagasi HA, Emre M. Treatment of behavioural symptoms and dementia in Parkinson's disease. *Fundam.Clin.Pharmacol.* 2005 Apr;19(2):133-146.

- Hout, P., Johnston, T.H., Koprach, J.B., Fox, S.H. and Brotchie, J.M. The pharmacology of L-DOPA-Induced dyskinesia in Parkinson's disease. *Pharmacological Reviews*. 65 (2013) 171-222.
- Jang, M., Shin, M., Cho, Y., Baik, H., Kim, S., Hwang, E. and Kim, C. 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethan-N,N,N'N'-tetraceticacid (BAMPTA-AM) inhibits caffeine-induced apoptosis in human neuroblastoma cells, *Neuroscience Letters*, 358 (2004) 189-192.
- Jankovic J. Motor fluctuations and dyskinesias in Parkinson's disease: clinical manifestations. *Mov.Disord.* 2005;20 Suppl 11:S11-6.
- Jenner P. A2A antagonists as novel non-dopaminergic therapy for motor dysfunction in PD. *Neurology* 2003 Dec 9;61(11 Suppl 6):S32-8.
- Jenner P. Istradefylline, a novel adenosine A2A receptor antagonist, for the treatment of Parkinson's disease. *Expert Opin.Investig.Drugs* 2005 Jun;14(6):729-738.
- Jenner P. Pathophysiology and biochemistry of dyskinesia: clues for the development of non-dopaminergic treatments. *J.Neurol.* 2000 Apr;247 Suppl 2:II43-50.
- Jimenez-Jimenez FJ, Molina JA, Orti-Pareja M. Pharmacological mechanisms of the treatment of dyskinesias in Parkinson disease. *Rev.Neurol.* 1999 May 1-15;28(9):889-898.
- Kanda T, Jackson MJ, Smith LA, Pearce RK, Nakamura J, Kase H, et al. Combined use of the adenosine A(2A) antagonist KW-6002 with L-DOPA or with selective D1 or D2 dopamine agonists increases antiparkinsonian activity but not dyskinesia in MPTP-treated monkeys. *Exp.Neurol.* 2000 Apr;162(2):321-327.

- Kanda, T., Jackson, M.J., Smith, L.A. Pearce, R.K. Nakamura, J., Kase, H., Kuwana, Y. and Jenner, P. combined use of th adenosine A(2A) antagonist KW-6002 with L-DOPA or with selective D1 or D2 agonist increases antiparkinsonian activity but not dyskinesas in MPTP-treated monkeys. *Exp. Neurol.* 162:2 (2000) 321-327.
- Kanda, T., Jackson, M.J., Smith, L.A., Pearce, R.K., Nakamura, J. Kase, H., Kuwana, Y. and Jenner, P. Adenosine A2A antagonist: a novel antiparkinsonian agent that does not provoke dyskinesia in parkinsonian monkeys. *Ann. Neurol.* 43:4 (1998) 507-513.
- Kang GA, Bronstein JM. Psychosis in nursing home patients with Parkinson's disease. *J.Am.Med.Dir.Assoc.* 2004 May-Jun;5(3):167-173.
- Kase, H. New aspects of physiological and pathophysiological functions of adenosine A2A receptors in basal ganglia. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.* 65(7) (2001) 1447-1457.
- Knutsen LJ, Weiss SM. KW-6002 (Kyowa Hakko Kogyo). *Curr.Opin.Investig Drugs* 2001 May;2(5):668-673.
- Koller WC, Tse W. Unmet medical needs in Parkinson's disease. *Neurology* 2004 Jan 13;62(1 Suppl 1):S1-8.
- Kulisevsky J, Barbanoj M, Gironell A, Antonijoan R, Casas M, Pascual-Sedano B. A double-blind crossover, placebo-controlled study of the adenosine A2A antagonist theophylline in Parkinson's disease. *Clin.Neuropharmacol.* 2002 Jan-Feb;25(1):25-31.
- Kulisevsky J, Roldan E. Hallucinations and sleep disturbances in Parkinson's disease. *Neurology* 2004 Oct 26;63(8 Suppl 3):S28-30.

- Kuwana, Y., Shiozaki, S., Kanda, T., Kurokawa, M., Koga, K., Ochi, M., Ikeda, K., Kase, H., Jackson, M.J., Smith, L.A., Pearce, R.K. and Jenner, P.G. Antiparkinsonian activity of adenosine A2A antagonist in experimental models. *Adv. Neurol.* 80 (1999) 121-123.
- Lagopoulos J, Malhi GS, Ivanovski B, Cahill CM, Morris JG. A matter of motion or an emotional matter? Management of depression in Parkinson's disease. *Expert Rev.Neurother* 2005 Nov;5(6):803-810.
- Lang AE, Obeso JA. Challenges in Parkinson's disease: restoration of the nigrostriatal dopamine system is not enough. *Lancet Neurol.* 2004 May;3(5):309-316.
- Lazic SE, Barker RA. The future of cell-based transplantation therapies for neurodegenerative disorders. *J.Hematother.Stem Cell Res.* 2003 Dec;12(6):635-642.
- Lee, C. Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. *Clinica chimica acta.* 295 (2000) 141-154.
- Leentjens AF. Depression in Parkinson's disease: conceptual issues and clinical challenges. *J.Geriatr.Psychiatry Neurol.* 2004 Sep;17(3):120-126.
- Lees A. Alternatives to levodopa in the initial treatment of early Parkinson's disease. *Drugs Aging* 2005;22(9):731-740.
- Levin BE, Katzen HL. Early cognitive changes and nondementing behavioral abnormalities in Parkinson's disease. *Adv.Neurol.* 2005;96:84-94.
- LeWitt PA, Nyholm D. New developments in levodopa therapy. *Neurology* 2004 Jan 13;62(1 Suppl 1):S9-16.

- Mathur R, Gupta YK. Adenosinergic and dopaminergic interaction in nigrostriatum in FeCl<sub>3</sub>-induced model of parkinsonism in rats. *Methods Find.Exp.Clin.Pharmacol.* 1999 Jul-Aug;21(6):435-439.
- Matsubara E, Shoji M, Abe K. The treatment of Parkinson's disease--adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonists. *Nippon Rinsho* 2002 Jan;60(1):112-116.
- Matsukawa N1, Maki M, Yasuhara T, Hara K, Yu G, Xu L, Kim KM, Morgan JC, Sethi KD, Borlongan CV. Overexpression of D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> receptors increases efficacy of ropinirole in chronically 6-OHDA-lesioned Parkinsonian rats. *Brain Res.* (2007) 1160:113-123.
- Dayne Mayfield R, Larson G, Orona RA and Zahniser NR. Opposing actions of adenosine A<sub>2a</sub> and dopamine D<sub>2</sub> receptor activation on GABA release in the basal ganglia: evidence for an A<sub>2a</sub>/D<sub>2</sub> receptor interaction in globus pallidus. *Synapse.* 1996 Feb;22(2):132-138.
- McDonald WM, Richard IH, DeLong MR. Prevalence, etiology, and treatment of depression in Parkinson's disease. *Biol.Psychiatry* 2003 Aug 1;54(3):363-375.
- Mentis MJ, Delalot D. Depression in Parkinson's disease. *Adv.Neurol.* 2005;96:26-41.
- Mierau J1, Schingnitz G. Biochemical and pharmacological studies on pramipexole, a potent and selective dopamine D<sub>2</sub> receptor agonist. *Eur J Pharmacol.* (1992) 215(2-3) 161-70.
- Morelli, M. Adenosine A<sub>2A</sub> antagonists: potential preventive and palliative treatment for Parkinson's disease. *Experimental Neurology* 184 (2003) 20-23.
- Morelli, M., Carta, A.R., Kachroo, A. and Schwarzchild, M.A. Pathophysiological roles for purines: adenosine, caffeine and urate. *Progress in Brain Research.* 183 (2010) 183-208.

- Mori, A. and Shindou, T. Modulation of GABAergic Transmission in the striatopallidal system by adenosine A2A receptors: a potential mechanism for the antiparkinsonian effects of A2A antagonists. *Neurology* 61 (11 suppl. 6) s44-s48.
- Muller T. Non-dopaminergic drug treatment of Parkinson's disease. *Expert Opin.Pharmacother.* 2001 Apr;2(4):557-572.
- Müller T. Suitability of the adenosine antagonist istradefylline for the treatment of Parkinson's disease: pharmacokinetic and clinical considerations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2013 Aug;9(8):1015-1024.
- Nishizaki, T. ATP-and Adenosine-Mediated signaling in the central nervous system: Adenosine stimulates glutamate release from astrocytes via A2A Adenosine receptors. *Journal of Pharmacological Sciences.* 94 (2004) 100-102.
- Obeso, J.A., Olanow, C.W. and Nutt, J.G. levodopa motor complications in Parkinson disease. *Trends in Neurosciences* 23 suppl. (2000) s8-s19.
- Ongini, E., Adami, M., Ferri, C. and Bertorelli, R. Adenosine A2A receptors and neuroprotection. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 825 (1997) 30-48.
- Paxinos, G. and Watson, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* 7<sup>th</sup> Edition. Academic Press Ed. USA, 2013.
- Pelligrino, D.A., Xu, H. and Vetri, F. Caffeine and the control of cerebral hemodynamics. *Journal of Alzheimer's disease.* 20(suppl 1) (2010) S51-S62.
- Petzer JP, Steyn S, Castagnoli KP, Chen JF, Schwarzschild MA, Van der Schyf CJ, et al. Inhibition of monoamine oxidase B by selective adenosine A2A receptor antagonists. *Bioorg.Med.Chem.* 2003 Apr 3;11(7):1299-1310.



- Petzer JP, Castagnoli N Jr, Schwarzschild MA, Chen JF, Van der Schyf CJ. Dual-target-directed drugs that block monoamine oxidase B and adenosine A(2A) receptors for Parkinson's disease. *Neurotherapeutics*. 2009 Jan;6(1):141-151.
- Popoli, P., Pintor, A., Domeici, M.A., Frank, C., Tebano, M.T., Pezzolla, A., Scarchilli, L., Quarta, D., Reggio, R., Malchiodi-albedi, F., Falchi, M. and Masotti, M. Blockade of striatal adenosine A2A receptor reduces, through a presynaptic mechanism, quinolinic, acid-induced excitotoxicity: possible relevance to neuroprotective interventions in neurodegenerative diseases of the striatum. *The journal of neurosciences*. 22(5) (2002) 1967-1975.
- Ravina BM, Fagan SC, Hart RG, Hovinga CA, Murphy DD, Dawson TM, et al. Neuroprotective agents for clinical trials in Parkinson's disease: a systematic assessment. *Neurology* 2003 Apr 22;60(8):1234-1240.
- Reinke, L. A., Nakamura, M., Logan, L., Christensen, D. and Carney, J. M. In vivo and in vitro 1-methylxanthine metabolism in the rat, *Drug metabolism and disposition*. 15(3) (1987) 295-299.
- Richardson, P.J. Kase, H. and Jenner, P.G. Adenosine A2A receptor antagonists as new agents for the treatment of Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci*. 18:9 (1997) 338-344.
- Ross, G.W. and Petrovich, H. Current evidence for neuroprotective effects of nicotine and caffeine against Parkinson's disease. *Drugs aging* 18:11 (2001) 797-806.
- Schiffmann, S.N., Fisone, G., Moresco, R., Cunha, R.A. and Ferre, S. Adenosine A2A receptors and basal ganglia physiology. *Progress in Neurobiology*. 83(5) (2007) 277-292.

- Sebatiao, A.M. and Ribeiro, J.A. Triggering neurotrophic factor actions through adenosine A2A receptor activation: implications for neuroprotection. *British Journal of Pharmacology*. 158 (2009) 15-22.
- Shi D, Daly JW. Chronic effects of xanthines on levels of central receptors in mice. *Cell.Mol.Neurobiol*. 1999 Dec;19(6):719-732.
- Shook, B.C. and Jackson, P.F. Adenosine A2A receptor antagonists and Parkinson's disease. *ACS Chemical Neuroscience*. 2 (2011) 555-567.
- Shook, B.C. and Jackson, P.F. Adenosine A2A receptor antagonists and Parkinson's disease. *ACS Chemical Neuroscience*. 2 (2011) 555-567.
- Silkis, I. The cortico-basal ganglia-thalamocortical circuit with synaptic plasticity. II. Mechanism of synergistic modulation of thalamic activity via the direct and indirect pathways through the basal ganglia. *Biosystems* 59:1 (2001) 7-14.
- Spinnewyn B1, Charnet C, Cornet S, Roubert V, Chabrier PE, Auguet M. An improved model to investigate the efficacy of antidyskinetic agents in hemiparkinsonian rats. *Fundam Clin Pharmacol*. (2011) 25(5) 608-18.
- Standaert, D.G. Adenosine A2A receptor modulation of motor systems for symptomatic therapy in Parkinson's disease. *Neurology* 61(11 suppl. 6) s30-s31.
- Stromberg I, Popoli P, Muller CE, Ferre S, Fuxe K. Electrophysiological and behavioural evidence for an antagonistic modulatory role of adenosine A2A receptors in dopamine D2 receptor regulation in the rat dopamine-denervated striatum. *Eur.J.Neurosci*. 2000 Nov;12(11):4033-4037.

- Tebano MT1, Martire A and Popoli P. Adenosine A(2A)-cannabinoid CB(1) receptor interaction: an integrative mechanism in striatal glutamatergic neurotransmission. *Brain Res.* 2012 Oct 2;1476:108-118.
- Thanvi BR and Lo TC. Long term motor complications of levodopa: clinical features, mechanisms, and management strategies. *Postgrad Med J.* 2004 Aug;80(946):452-458.
- Yu L, Schwarzschild MA, Chen JF. Cross-sensitization between caffeine- and L-dopa-induced behaviors in hemiparkinsonian mice. *Neurosci.Lett.* 2006 Jan 23;393(1):31-35.
- Zezula, J. and Freissmuth, M. The A2A-adenosine receptor: a GPCR with unique features? *British Journal of Pharmacology.* 153 (2008) S184-S190.

# **Anexo A**

## Homology modeling, molecular dynamics and docking simulations of rat A<sub>2A</sub> receptor: A three-dimensional model validation under QSAR studies

Luis C. Jimenez-Botello<sup>1</sup>, Marvin A. Soriano-Ursúa<sup>2</sup>, Omar Deeb<sup>3</sup>, Aldo Segura-Cabrera<sup>4</sup>, M. Martínez-Archundia<sup>2</sup> and J. Correa-Basurto<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Escuela de Medicina, Departamento de Ciencias Básicas, Escuela de Ciencias de la Vida ITESM Campus Ciudad de México, Calle del puente 222, Colonia Ejidos de Huipulco, Del. Tlalpan, 14380, México, D. F., <sup>2</sup>Laboratorio de Modelado Molecular y Bioinformática de la Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional. Plan de San Luis y Díaz Mirón, Del. Miguel Hidalgo, 11340, México City, México. <sup>3</sup>Faculty of Pharmacy, Al-Quds University, Jerusalem, Palestine. <sup>4</sup>Laboratorio de Bioinformática, Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, Boulevard del Maestro esquina Elías Piña, Colonia Narciso Mendoza, 88710, Ciudad Reynosa, Tamaulipas, México

### ABSTRACT

Understanding the three-dimensional structure (3-D) of GPCRs (G protein coupled receptors) can aid in the design of applicable compounds for the treatment of several human disorders. To this end, several 3-D models have been obtained in recent years. In this work, we have built the rat adenosine receptor model (rA<sub>2A</sub>R) by employing computational tools. First, the 3-D rA<sub>2A</sub>R model was built by homology modeling using the human adenosine receptor (hA<sub>2A</sub>R) structure (PDB codes: 3EML) as a template. Then, the rA<sub>2A</sub>R model was refined by molecular dynamics simulations, in which the initial and refined 3-D structures were used for molecular docking simulations and Quantitative structure-activity relationship (QSAR) studies using a set of known experimentally tested ligands to validate this rA<sub>2A</sub>R model. The results showed that the hindrance effect caused by ribose attached to agonists play an important role in activating the receptor via formation of several hydrogen bonds. In contrast, the lack of this

moiety allows blocking of the receptor. The theoretical affinity estimation shows good correlation with reported experimental data. Therefore, this work represents a good example for getting reliable GPCR models under computational procedures.

**KEYWORDS:** A<sub>2A</sub> adenosine receptor, homology modeling, xanthine, drug development, rat brain, Parkinson's disease

### 1. INTRODUCTION

The A<sub>2A</sub> adenosine receptor (A<sub>2A</sub>R) is a seven-transmembrane domain receptor (7TM) that belongs to the family A of GPCRs (G protein coupled receptors). This receptor has been implicated in several physiological functions, including some diseases of the central nervous system (e.g., Parkinson's disease) [1]. This adenosine receptor can form heteromeric complexes with D<sub>2</sub>-dopamine receptors or with metabotropic glutamate receptors, and it is also known that this 7TM activate proteins involved in intracellular signaling [2]. The A<sub>2A</sub>R can be blocked or activated by compounds that share very similar

\*Corresponding author: jcorreab@ipn.mx

chemical cores (scaffolds). In fact, some xanthine-containing antagonists are used to decrease the motor symptoms in Parkinson's disease (PD) [2, 3]. Additionally, other studies report the use of A<sub>2A</sub>R agonists to treat hypertension, ischemic cardiomyopathy, inflammation and atherosclerosis [4]. These evidences have provided incentive to study and to develop more selective A<sub>2A</sub>R ligands [5]. To reach this goal, it is useful to employ the murine models used in drug development for PD treatments and for other diseases of the central nervous system [4-7].

Currently, drug development research explores the ligand and protein targets at an atomic level by constructing three-dimensional (3-D) models of these membrane receptors, whose structures are very difficult to crystallize [8, 9]. This difficulty is related to the location of these proteins inside the lipid bilayer membrane; that is why only few 3-D structures have been solved for these proteins using X-ray methods.

Due to the previously mentioned difficulties, computational tools are widely used to obtain 3-D models of GPCRs, for example by computing *ab initio* calculations, sequence threading and homology modeling. The homology modeling utilizes experimental data obtained from the Protein Data Bank (PDB) named "template". Initially, some reports have used the bovine rhodopsin (the first GPCR characterized) as a template. However, this template yields poor quality structures for the A<sub>2A</sub>R 3-D models. This is due to distant homology relationship between bovine rhodopsin and other GPCR targets. Hence, bovine receptor would not be an adequate template to construct the rA<sub>2A</sub>R model [4]. As the structures of hA<sub>2A</sub>R bound to antagonist [9] and agonist [10] have recently been solved by X-ray methods, it is possible to use both structures as templates for additional adenosine GPCR models to study the molecular recognition properties. Currently, several studies support the use of 3-D structures of A<sub>2A</sub>R as experimental and theoretical tools for the development and testing of new drugs [11-15].

According to experimental data, there are several compounds that act on A<sub>2A</sub>R receptors [1, 4-7]. Some ligand-A<sub>2A</sub>R interactions and affinities have been reported from *in vitro* experiments and from

mathematical studies on animal tissues [4, 8, 16-20]. However, some of these ligands have not been studied using theoretical methods and therefore do not explain the ligand recognition on A<sub>2A</sub>R structure at an atomic level.

The aim of this study was to generate an adenosine receptor model from rat (rA<sub>2A</sub>R), an animal widely used for experimental and preclinical studies. We refined and validated this model constructed by homology modeling. The refinement of this model was through molecular dynamics (MD) simulations, whereas the 3-D model validation was using molecular docking simulations and QSAR studies.

## 2. Computational procedures

### 2.1. Ligand retrieval

A set of 48 known A<sub>2A</sub>R ligands, consisting of 15 antagonists (Table 1) and 33 agonists (Table 2), were docked on all A<sub>2A</sub>R 3-D models (i.e., the rA<sub>2A</sub>R, the native hA<sub>2A</sub>R 3-D structures as well as five snapshots retrieved from MD simulations of rA<sub>2A</sub>R). The minimum ligand structure energies were obtained via DFT at the B3LYP/6-31G (d,p) level using Gaussian 98 software [21].

### 2.2. Homology modeling of the A<sub>2A</sub>R

The amino acid sequence of the rA<sub>2A</sub>R with accession number NP\_445746 was retrieved from NCBI [22]. The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) found several homologous human proteins with known 3-D structures located in the Protein Data Bank (PDB). To obtain the rA<sub>2A</sub>R 3-D model, the Swiss Model server [23-25] was used to perform the homology modeling procedure using the hA<sub>2A</sub>R 3-D structure as a template (PDB code: 3EML) [10].

First, all hydrogen atoms on the A<sub>2A</sub>R model were added and then minimized in 500 steps with the steepest descendent algorithm, which is employed by GROMOS96 43B1 parameters implemented in the Swiss-PDB Viewer version 3.7. We used the TM-score [26] and TM-align tools [27] (available from the Zhang lab at <http://zhang.bioinformatics.ku.edu>) to compare the two 3-D models employed in this study. The backbone conformation of both A<sub>2A</sub>R models was evaluated by Psi/Phi



## Computational studies on rat A<sub>2A</sub>

**Table 1.** Experimental and calculated affinity values from docking analyses for antagonist ligands tested.

Antagonist ligand	Experimental <sup>a</sup> K <sub>d</sub> reported in literature (nM)		Calculated affinity values on the respective models (nM)	
			hA <sub>2A</sub> R	rA <sub>2A</sub> R
KW6002 <sup>a</sup>	2	[8]	463	1080
XAC <sup>a</sup>	24	[8]	73.3	135
11ad <sup>b</sup>	14	[20]	1040	2510
11ae <sup>b</sup>	17	[20]	771	2260
11aa <sup>b</sup>	18	[20]	407	1400
11bd <sup>b</sup>	21	[20]	729	819
11ab <sup>b</sup>	22	[20]	422	1010
11ac <sup>b</sup>	25	[20]	1020	1200
11ba <sup>b</sup>	29	[20]	276	432
11af <sup>b</sup>	30	[20]	868	2320
11bc <sup>b</sup>	32	[20]	1320	938
11bb <sup>b</sup>	33	[20]	965	932
DPCPX <sup>a</sup>	340	[8]	1440	1770
Theophylline <sup>a</sup>	1995.26	[16]	16900	17700
Caffeine <sup>a</sup>	2511.89	[16]	30300	36800

<sup>a</sup> From rat striatal membranes. [number] = reference

<sup>b</sup> From pig membranes. [number] = reference

Ramachandran diagrams using the Rampage server [28]. Then, to validate our rA<sub>2A</sub>R model built by HOMOLOGY MODELING, docking simulations were performed using a set of known ligands (agonists and antagonists).

### 2.3. Molecular dynamics simulations

As rA<sub>2A</sub>R is one of the principal targets in this report, we performed MD simulations to refine and to provide evidence of its conformational movements. These simulations were performed by using the GROMACS software package, 4.5.3 version [29]. Structural data for a pre-equilibrated 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholine (POPC) bilayer with 128 lipid molecules were downloaded from the Tieleman group ([http://moose.bio.ucalgary.ca/index.php?page=Structures\\_and\\_Topologies](http://moose.bio.ucalgary.ca/index.php?page=Structures_and_Topologies)). The protein was then embedded in the pre-equilibrated POPC lipid bilayer using the perl inflategro script from Tieleman's group, performing several rounds of energy minimization. Furthermore, after 23 iterations of scaling down by 0.95,

an area of ~74 Å<sup>2</sup> per lipid was reached. This value was greater than the experimental value of ~66 Å<sup>2</sup> because the inflategro script tends to overestimate the area per lipid [30]. This calculated value, however, was sufficient to continue to the equilibration step.

All systems were equilibrated using simulated annealing under an isothermal-isobaric (NPT) ensemble for 500 ps. The LINCS method [31] was used to restrain all of the heavy atoms in all directions, and this method was also used to restrain the phosphorus atoms of the lipid head groups in the vertical (z) direction, allowing a 2 fs integration step. The use of simulated annealing under NPT ensemble avoided solvent voids that distort the dimensions of the unit cell.

Following simulated annealing, NPT equilibration was performed for 500 ps applying a pressure of 10 MPa in the transverse direction and 0.1 MPa in the vertical direction. Water, lipids and protein were coupled separately to a temperature bath at

**Table 2.** Experimental and calculated affinity values from docking analyses for agonist ligands tested.

Agonist ligand	Experimental <sup>a</sup> $K_d$ reported in the literature (nM)		Calculated affinities values on the respective models (nM)	
			hA <sub>2A</sub> R	rA <sub>2A</sub> R
19g	1.23	[17]	300	42.3
2g	1.43	[17]	25.6	21.6
23g	1.77	[17]	158	204
3g	2.38	[17]	72.6	412
13g	2.41	[17]	32.1	119
25g	2.42	[17]	51.9	66.3
9g	2.45	[17]	126	452
22g	2.75	[17]	252	303
5g	2.83	[17]	11.8	298
17g	2.87	[17]	461	19800
21g	2.90	[17]	19	2240
11g	2.95	[17]	182	184
12g	2.96	[17]	112	139
8g	3.02	[17]	297	75.6
7g	3.07	[17]	1170	367
15g	3.20	[17]	148	250
29g	3.22	[17]	6.65	21.8
6g	3.25	[17]	270	556
16g	3.27	[17]	229	114
4g	3.29	[17]	104	331
28g	3.37	[17]	5.96	11.6
20g	3.40	[17]	36.9	89.7
14g	3.42	[17]	138	377
10g	3.47	[17]	87.4	484
1g	3.55	[17]	56.1	24.8
26g	3.85	[17]	5.66	6.64
27g	4.69	[17]	7.38	1530
NECA	20	[17]	1180	1210
CGS21680	24	[16]	41.7	43.7
CADO	180	[3]	1120	1310
RPIA	794	[16]	76.4	83.6
CPA	794.33	[3]	230	186
Adenosine	2511.89	[16]	2930	1630

<sup>a</sup> From rat striatal membranes, except for CPA (which is from hA<sub>2A</sub>R expressed in CHO cells).  
[number] = reference



300 K with a relaxation time ( $\tau_T$ ) of 0.2 ps using a Berendsen thermostat [32]. Each group (protein/cholesterol, lipids, and solvent/ions) was coupled to a separate temperature bath. The parameters developed by Berger *et al.* [33] were applied to the POPC lipids, and the gromos96 53a6 parameter set was used to describe the rest of the systems (protein, solvent and ions). Lennard-Jones interactions were cut off at 1.4 nm, and short-range, non-bonded interactions were calculated with a twin-range cut off scheme (0.9/1.4 nm) updating the neighbor list every five simulation step. Electrostatic interactions were calculated using the particle mesh Ewald algorithm using a fourth-order spline interpolation and a Fourier grid spacing of 0.12 nm. This treatment of electrostatics has been shown to provide an accurate representation of lipid properties [34], and it is also commonly used in simulations of proteins. Following 1000 ps of equilibration, production of this MD simulation was conducted using an NPT ensemble. A pressure of 0.1 MPa was applied in all directions, and all other parameters were the same as those used in the NPT equilibration. All position restraints were removed prior to the production phase. Simulations were conducted using the Argentum cluster at the Centro Nacional de Supercomputo. Coordinates were saved every 2 ps for analysis. All analyses were performed using tools included in the GROMACS package. Subsequently, the dynamic behavior and structural changes of the protein were analyzed by the calculation of the root mean square fluctuations (RMSF) and the root mean square deviations (RMSD) values. The refined model was evaluated using the ANOLEA [35] and ProSA [36] programs.

#### 2.4. Docking simulations

The rA<sub>2A</sub>R and hA<sub>2A</sub>R 3-D native structures and snapshots retrieved from the rA<sub>2A</sub>R MD simulations (taken at 0, 5, 10, 15 and 20 ns) were used to perform docking simulations using Autodock 4.0.1. For this procedure, we used the Lamarckian genetic algorithm, which is a combination of the genetic algorithm method for global and local search to perform energy minimization [37]. Before starting the docking evaluations, the partial atomic charges (Gasteiger-Marsili formalism),

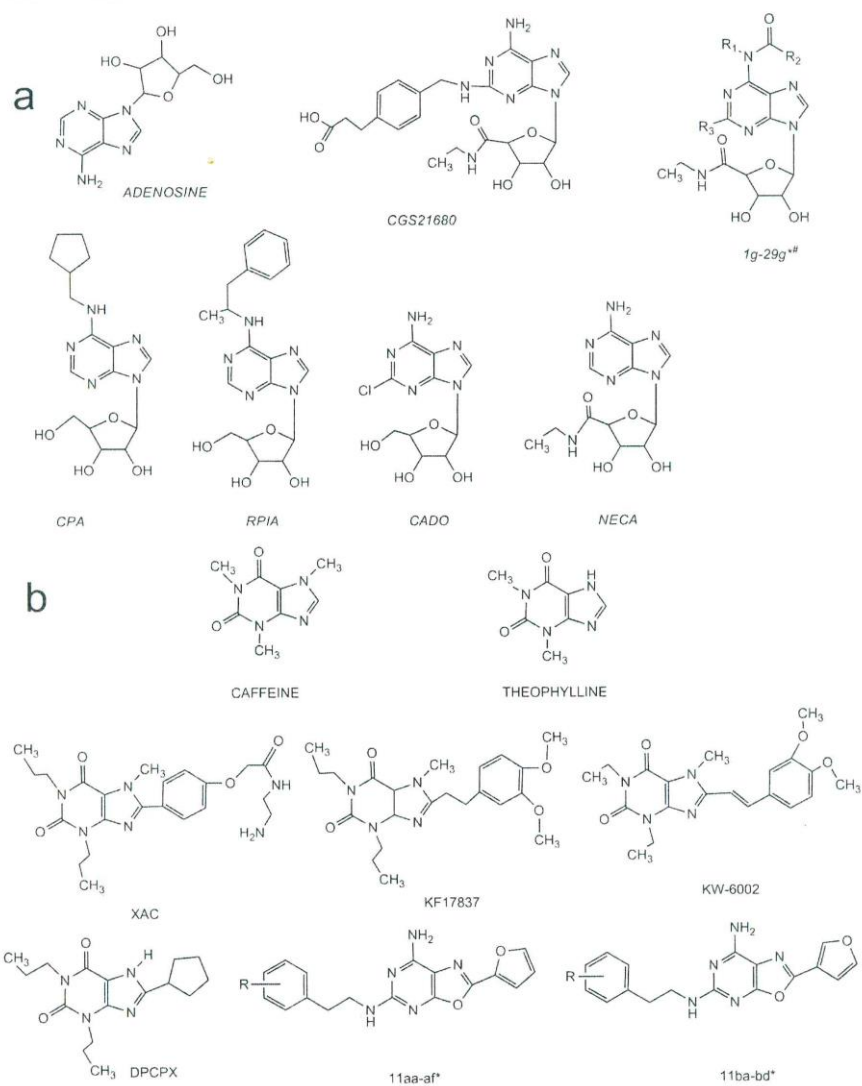
all possible routable bonds of the ligands, Kollman charges for A<sub>2A</sub>R atoms and the hydrogen atoms located in heteroatoms were added at ~ pH 7.4 with the AutoDock Tools 1.5.2 [38].

A cubic grid box (80 × 80 × 80 Å) with grid points separated by 0.375 Å was constructed and centered at a midpoint between the coordinates corresponding to the amino acids in positions Leu85 and Leu249 (3.33 and 6.51, respectively) for hA<sub>2A</sub>R, according to the Ballesteros-Weinstein designation [39]. These amino acids are considered to be the conserved key positions for ligand-interactions in other mammalian species [10, 15, 40]. All docking simulations were performed with an initial population of 100 randomly placed individuals and a maximum number of energy evaluations ( $1.0 \times 10^7$ ).

The resulting docked orientations within a RMSD of 0.5 Å were clustered together. The lowest energy cluster returned by AutoDock for each compound was used for further analysis. All other parameters were maintained considering the default settings. All of the docking result visualizations were performed by using the Visual Molecular Dynamics (VMD) program version 1.6 [41].

#### 2.5. Molecular descriptors

The 48 known A<sub>2A</sub>R ligands (Tables 1, 2 and Scheme 1) employed in the docking protocol were tested. The ligand structures were structurally optimized by DFT at the B3LYP/6-31G<sub>d,p</sub> level using Gaussian 98 software [21]. Then, the Dragon software was used to calculate 1481 descriptors grouped into 16 groups. In addition, the calculated electronic descriptors obtained from HyperChem Version 7.0 (Hypercube, USA, <http://www.hyper.com>) were considered as another group. Therefore, 17 groups of descriptors were used in this study. In each group, the calculated descriptors were examined for the presence of constant or near constant values for all molecules. To decrease redundancy in the descriptors data matrix, the correlation among descriptors was examined, and the detected collinear descriptors (i.e.,  $R^2 > 0.95$ ) were removed from the data matrix. Accordingly, 589 descriptors were calculated.



**Scheme 1.** The set of  $A_{2A}$  ligands tested (a = agonist and b = antagonists). \* Only the pharmacophore of these ligands is depicted. The full structure of this ligand is in references 17 or 20 for 1g-29g and 11aa-af and 11ba-bd. Ligands 18g and 24g are not included.

**Table 3.** Descriptors selected by MLR for each group.

Group <sup>a</sup>	Descriptors
G1	C-042, C-016, H-050, H-051, C-040, O-059
G2	T12, VRA1, P12, X1A, Ram, ICI, piID
G3	MWC05, SRW09, MWC10, SRW05
G4	BEHm7, BELe8, BELm2, BEHe1, BELv1
G5	JG110, GGI10, GGI4, JGI4
G6	MATS3p, MATS8v, GATS4e, MATS4v, MATS5v, MATS3e, MATS2p, ATS1e
G7	RNCG, RPCG
G8	AROM, RCI
G9	SHP2
G10	FDI, SPAN
G11	RDF065p, RDF010m, RDF035u, RDF045m, RDF055v
G12	Mor20u, Mor25u, Mor05u, Mor12u, Mor13m, Mor32m, Mor18u
G13	G1v, Dv, E2s, E3u
G14	HATS4u, R5v+, R4m, H3m
G15	nHAcc, nOHp, n=CHR, nCONR2, nNHRPh, nPhX, nCs, nCONHRPh
G16	C-042, C-016, H-050, H-051, C-040, O-059
G17	Ref, HD, ELPH

<sup>a</sup>G1: constitutional descriptors, G2: topological descriptors, G3: molecular walk counts, G4: BCUT descriptors, G5: Galvez topological charge indices, G6: 2D autocorrelations, G7: charge descriptors, G8: aromaticity index, G9: Randic molecular profiles, G10: geometrical descriptors, G11: RDF descriptors, G12: 3D-MoRSE descriptors, G13: WHIM descriptors, G14: GETAWAY descriptors, G15: functional groups, G16: atom-centered descriptors, G17: electronic descriptors.

## 2.6. QSAR analysis

For QSAR studies, SPSS Software (version 16.0, SPSS, Inc.) was used for the simple multiple linear regression (MLR) analysis. QSAR analysis of the docking results was performed using MLR analysis with stepwise selection and elimination of variables. This was performed to model the relationships between experimental binding affinities (i.e., log K<sub>d</sub> values) with a set of 589 descriptors. This evaluation was performed in a similar manner to the procedure that we had used in a previous study [42].

MLR analysis was performed separately for each set of the 17 groups of descriptors (G1-G17, see Table 3) while accounting for the experimental log K<sub>d</sub> values. Finally, the best descriptors, chosen both by stepwise selection and by elimination of variables from each group, were gathered into one set. Another MLR was performed on this new set

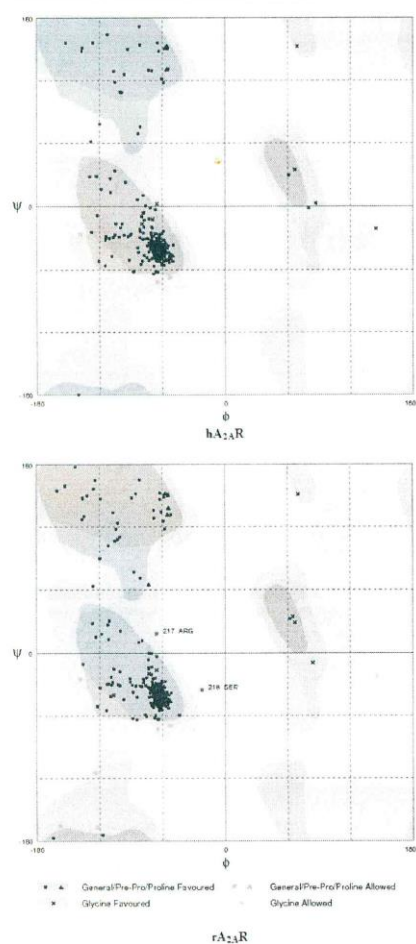
of optimal descriptors obtained from the set of 48 ligands. Furthermore, MLR analysis was carried out for the antagonist set (15 ligands) and for the agonist set (33 ligands) with the best descriptors selected from the original 48 A<sub>2A</sub>R ligands.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1. Homology modeling

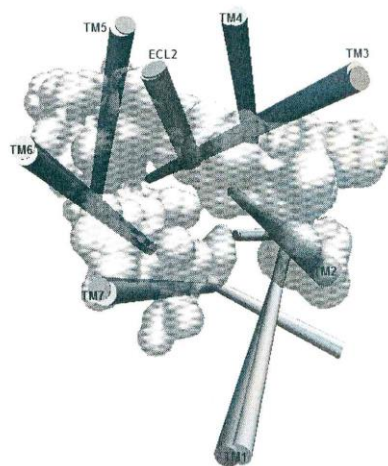
The BLAST results for rA<sub>2A</sub>R indicated the highest sequence identity (82%) with hA<sub>2A</sub>R (NP\_000666.2) [27, 34-36], suggesting that hA<sub>2A</sub>R was the most suitable template for HOMOLOGY MODELING. Moreover, the high percent identity between rA<sub>2A</sub>R and hA<sub>2A</sub>R reflects a close homology relationship that could help to explain the same experimental affinity values obtained either from these animal models or from human models, particularly with A<sub>2A</sub>R agonists derived from adenosine [43].





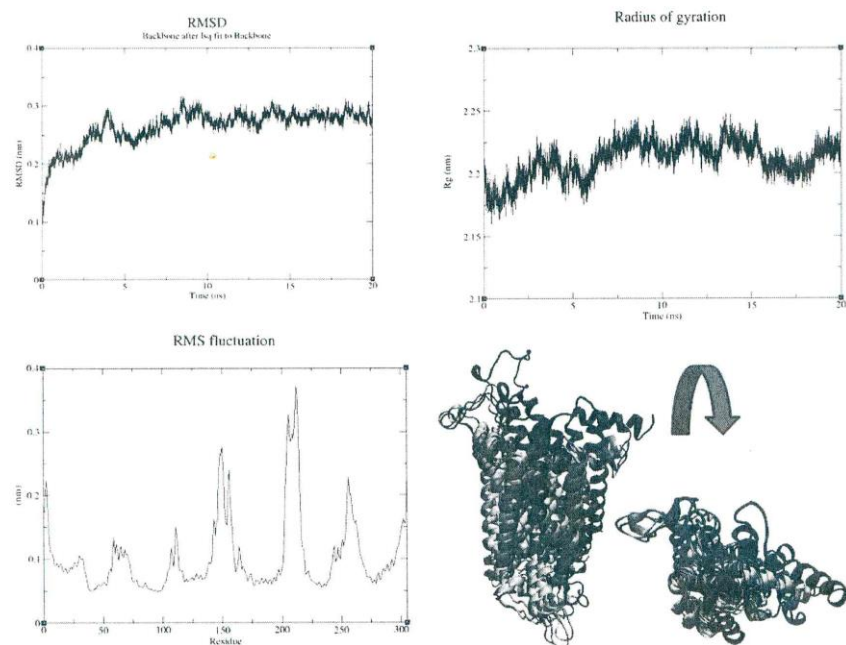
**Figure 1.** Ramachandran plots of hA<sub>2A</sub>R (PDB code: 3EML, top panel) and rA<sub>2A</sub>R (lower panel). The residues in disallowed regions are labeled.

To evaluate the reliability of A<sub>2A</sub>R models built for docking purposes, we used a Ramachandran plot (Figure 1). These methods identify the Psi/Phi angle distribution in the 3-D model within the allowed or disallowed regions. For hA<sub>2A</sub>R,



**Figure 2.** The superimposed hA<sub>2A</sub>R (dark) and rA<sub>2A</sub>R (light) 3D models (only the alpha helices are depicted for clarity). The transparent surface shows the amino acids that are in contact with the co-crystallized ligand (ZM241385) in hA<sub>2A</sub>R and in same position on rA<sub>2A</sub>R.

no residues were located in disallowed conformations, whereas for rA<sub>2A</sub>R, only two residues (Arg217 and Ser218) were found. Additionally, 3-D overlapping of the native human and rat A<sub>2A</sub>R models shows great similarity, possibly due to the homology modeling procedure (Figure 2). With the TM-score and TM-align programs, a value of TM-score = 0.4510 was obtained, and an RMSD of 0.64 Å between hA<sub>2A</sub>R and rA<sub>2A</sub>R was found [26, 27] yielding a better 3-D model than those previously obtained for the rA<sub>2A</sub>R model (e.g. Kim *et al.*) [44] who reported an RMSD = 1.27 using rhodopsin as the template. Therefore, our rA<sub>2A</sub>R model can be considered reliable and useful for generating meaningful predictions [4]. Furthermore, we decided to perform MD simulations as performed elsewhere [45]. The long MD simulations permit visualization of the active or inactive structures that can explain the agonist or antagonist conformational movements [46]. In this case, we performed MD simulations to identify the principal structural changes that occur during 20 ns of MD simulations, which is enough



**Figure 3.** MD simulations of rA<sub>2A</sub>R to test some structure snapshots. Panels indicate the root-mean square deviation (RMSD), the radius of gyration (R<sub>g</sub>), the root-mean square fluctuation (RMSF) and the 3-D structure alignment for all snapshots retrieved from the MD simulations.

time to reach convergence according to the RMSD and the radius of gyration, (Figure 3). During this time, it was clear that there is a greater movement in the loops in comparison with the zones that belong to the TM domain, which the 3-D model indicates is more stable than the loops. Despite the notable structural movements, it is not easy to show the active or inactive conformations because they occur at microsecond time scales [47].

### 3.2. Comparative analysis of experimental vs. predicted ligand affinities for the A<sub>2A</sub>R models

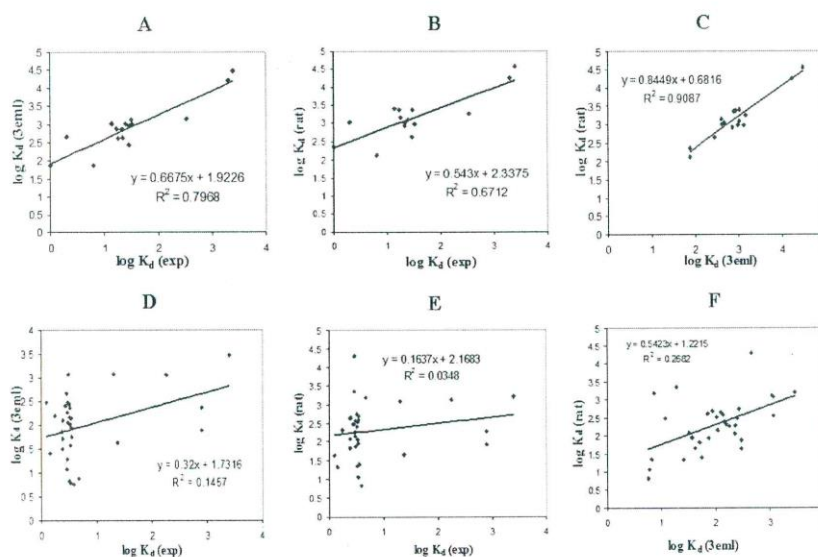
Once the rA<sub>2A</sub>R model was obtained by homology modeling, a docking study was performed, considering ligands whose experimental affinity data are available (Scheme 1 and Tables 1 and 2). After docking simulations, the log K<sub>d</sub> values were obtained from free energy ( $\Delta G$ ) values resulting from the ligand-protein interactions (Eq. 1).

$$\Delta G = \Delta G_{vFW} \sum_{ij} \left( \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + \Delta G_{hbond} \sum_{ij} E(t) \left( \frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) + \Delta G_{elec} \sum_{ij} \frac{q_i q_j}{\epsilon(r_{ij}) r_{ij}} + \Delta G_{solv} N_{solv} + \Delta G_{solv} \sum_{ij} (S_i V_j + S_j V_i) e^{-\left( -r_{ij}^2 / 2\sigma^2 \right)} \quad (\text{Eq. 1})$$

where the five  $\Delta G$  terms on the right-hand side are coefficients empirically determined using linear regression analysis from a set of protein-ligand complexes with known binding constants. The summations are performed over all pairs of ligand atoms,  $i$ , and protein atoms,  $j$ . The *in vacuo* contributions include three interaction energy terms: a Lennard-Jones 12-6 dispersion-repulsion term, a directional 12-10 hydrogen bonding term and a screened Coulombic electrostatic potential [37].

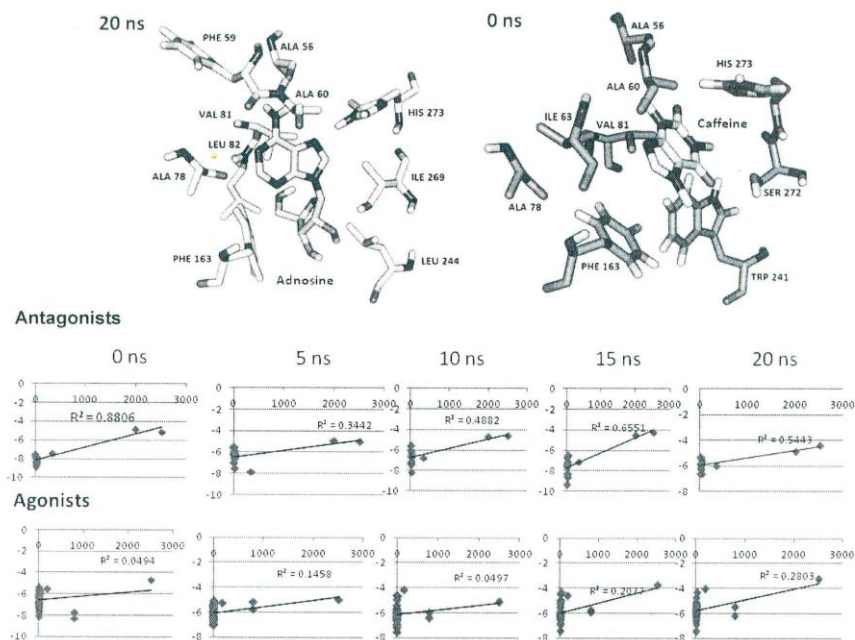
The  $K_d$  values from hA<sub>2A</sub>R and rA<sub>2A</sub>R were used to perform a correlation study (Figure 4 A-C) with experimental data and we could identify a good relationship for the antagonist ligands ( $R^2 = 0.6712$  and  $0.7968$ , respectively) but not for the agonist ligands (Figure 4D-F). On the other hand, as it is not reliable to make any assertions based upon the initial 3-D structure, we performed a MD

simulation (Figure 3) to explore the conformational space and to try to explore the local conformational changes. Then, we selected these snapshots as targets for docking of agonists or antagonists, respectively. The results (Figure 5) suggest that rA<sub>2A</sub>R maintains its inactive conformation (based on the relationship between the experimental and theoretical data). This is because the rA<sub>2A</sub>R maintain the best relationship with the antagonist ligands for both the native rA<sub>2A</sub>R and the snapshots retrieved from the rA<sub>2A</sub>R MD simulations [48, 49]. Figure 5 depicts the binding pose of the best relationship with the agonist (20 ns,  $R = 0.28$ ) or antagonist (0 ns  $R = 0.88$ ). The figure also depicts adenosine as the best example of agonist, which shows interactions with His273 (via formation of hydrogen bonds), and this arrangement is in agreement with recent



**Figure 4. Antagonist ligands** A) Correlation between  $\log K_d$  obtained from hA<sub>2A</sub>R docking versus experimental  $\log K_d$  values, B) between  $\log K_d$  obtained from rA<sub>2A</sub>R docking versus experimental  $\log K_d$  values, and C) between  $\log K_d$  obtained from rA<sub>2A</sub>R docking versus  $\log K_d$  observed from the hA<sub>2A</sub>R docking values. **Agonist ligands,** D) correlation between  $\log K_d$  obtained from hA<sub>2A</sub>R docking versus experimental  $\log K_d$  values, E) between  $\log K_d$  obtained from rA<sub>2A</sub>R docking versus experimental  $\log K_d$  values and F) between  $\log K_d$  obtained from rA<sub>2A</sub>R docking versus  $\log K_d$  observed from the hA<sub>2A</sub>R docking values.





**Figure 5. (below)** relationship between K<sub>d</sub> values (x-axes) and free energy values (ΔG, Kcal/mol), **(above)** adenosine **(left)** and caffeine **(right)** docked on the structures that exhibit the best relationship at 20 ns and 0 ns, respectively.

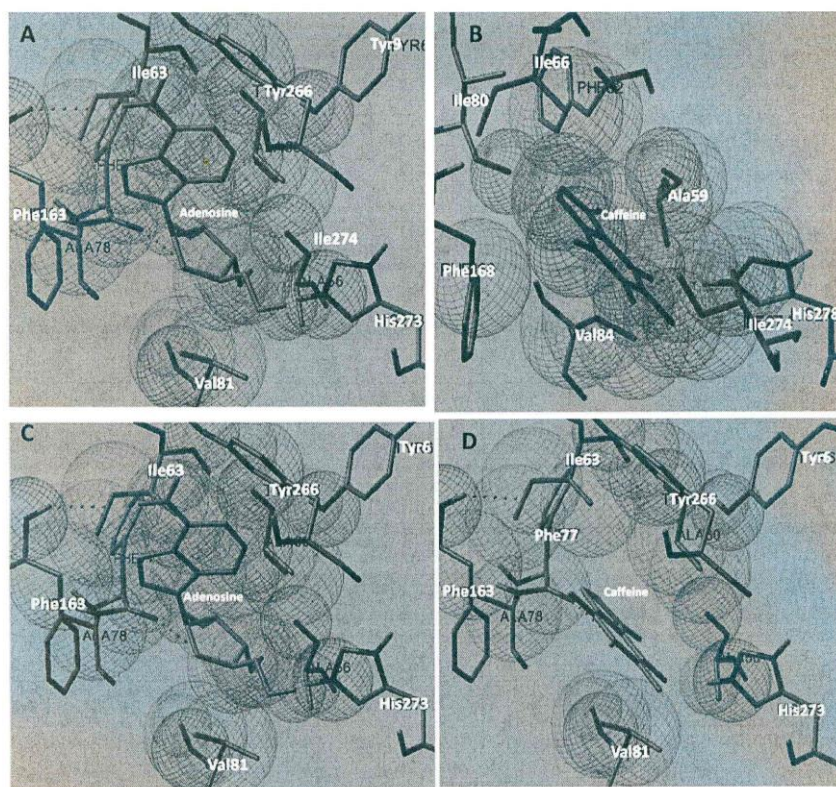
X-ray structure data obtained for hA<sub>2A</sub>R [10]. For the antagonist models, we depicted caffeine, which participates in a  $\pi$ - $\pi$  interaction with Phe163, and these interactions are reported in the crystal structure of the human adenosine receptor A<sub>2A</sub>R in complex with a high affinity subtype-selective antagonist bound ZM132485 [9].

### 3.3 Specific interactions of selected ligands on A<sub>2A</sub>R and their biological relationship

To explore the specific interactions of ligands on A<sub>2A</sub>R, a close view of each ligand in its highest affinity conformation obtained by docking was analyzed. The hA<sub>2A</sub>R protein was solved in complex with ZM132485 [10]. This complex shows that hA<sub>2A</sub>R recognizes ZM132485 in a binding site constituted by aromatic (Phe168, Trp246 and Tyr271), basic (Asn253, Asn181,

His250 and His264,) acidic (Glu169) and hydrophobic (Leu85, Met177, Leu249, Ile274, Leu267, Ala265 and Met270) residues. These residues form a pocket capable of recognizing ligands (agonists or antagonists) which share five-six cycle core reported elsewhere. Furthermore, these interactions explain why most of the ligands tested here recognize this site (Figure 6). In addition, one of the most important findings is that the ribose moiety is oriented towards His278 and His273 for both the human and the rat adenosine receptors (Figures 6A and C, respectively). These results are also in agreement with the experimental data published elsewhere [10].

For the caffeine docking studies, results showed that the ligand establishes interactions with the side chains of Phe168 and Phe163 by  $\pi$ - $\pi$

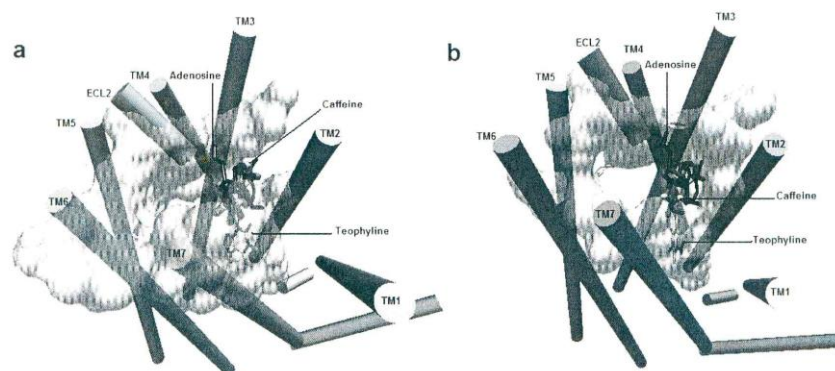


**Figure 6.** Adenosine on hA<sub>2A</sub>R (A) and rA<sub>2A</sub>R (C) and caffeine on hA<sub>2A</sub>R (B) and rA<sub>2A</sub>R (D).

interactions on hA<sub>2A</sub>R (Figure 6B) and rA<sub>2A</sub>R (Figure 6D), respectively. Similar interactions were found for adenosine at the bi-cycle moiety. The adenosine purine moiety has a similar spatial disposition on hA<sub>2A</sub>R to that of the purine moiety of ZM132485. Indeed, the highest affinities for both complexes between r/hA<sub>2A</sub>R and caffeine or adenosine exhibit the same binding site because they are overlapped. In general, all of the A<sub>2A</sub>R ligands tested have the same bi-cycle moiety. The main differences between them are in the side chain of the ligands, and they differ by a ribose located in the agonist ligands. These data explain

the differences between the A<sub>2A</sub>R binding sites and the affinity binding values (Table 2 and Figure 6). For example, theophylline has fewer hindrance effects than the others, allowing it to reach the same site more deeply (Figure 6 and 7) interacting with residues in the TMs 2,3,6 and 7 (Supplementary Figure 1). The major obstacle for accessing the binding site is the micro-switch formed by the conserved residue at position 6.48 (Trp246 on hA<sub>2A</sub>R and Trp241 on rA<sub>2A</sub>R). Conversely, the large conformational changes of the Trp residues mentioned during 7TM activation permit ligand accessibility [50]. All of the ligands





**Figure 7.** The hA<sub>2A</sub>R (a) and rA<sub>2A</sub>R (b) complexes with adenosine (dark) and two antagonists: caffeine and theophylline (light). The amino acids considered key in 7TM receptors by Fatakia *et al.* [40] are depicted as a transparent surface in each case.

tested showed a similar binding site except for theophylline, which reaches a deeper binding site due to its small volume. This behavior could be associated with the different responses found in clinical assays studying the effect of methylxanthines commonly included in diets [17, 51, 53]. For instance, Tan *et al.* [52] found that reduction of PD risk varies between green and black tea consumption. Yu *et al.* [53] found greater nervous system stimulation by caffeine than by theophylline. These differences could also be related to the variations in caffeine content found in each tea [51, 54]. Additionally, this difference could involve other mechanisms of action of xanthine compounds, including the inhibitory activity on phosphodiesterase [55]. One explanation for these different effects could be stimulation at different sites on A<sub>2A</sub>R that play an important role in the activation of the receptor. The differences could be related to the selectivity given by extracellular loop amino acids in A<sub>2A</sub>R and other 7TMs [56].

#### 3.4. MLR-QSAR results and their implications in ligand binding

Table 3 summarizes the descriptors chosen from the MLR of experimental log K<sub>d</sub> values with the 17 groups of descriptors (G1-G17). The final regression models obtained from MLR analysis and executed on the best sets of descriptors are

shown below (See Table 4 for a clarification of the descriptors' names).

##### Final MLR regression model for both agonist and antagonist ligands

$$\begin{aligned} \log K_d = & 8.638868 (\pm 2.073478) - 0.37185 \\ & (\pm 0.107628) \text{Mor20u} \\ & - 3.45225 (\pm 0.559607) \text{MATS3p} + 0.630345 \\ & (\pm 0.11321) \text{Mor25u} \\ & - 2.09376 (\pm 0.351586) \text{MATS8v} + 0.921764 \\ & (\pm 0.142635) \text{C-042} \\ & - 5.2713 (\pm 1.759311) \text{ATS4e} - 3.11057 \\ & (\pm 0.76633) \text{AROM} \\ & - 0.63123 (\pm 0.162349) \text{GGI4} + 0.647461 \\ & (\pm 0.286081) \text{BEHm7} \end{aligned} \quad (1)$$

$$\begin{aligned} N = 49, R = 0.980, R^2 = 0.961, R^2_A = 0.952, \\ S = 0.198, R^2_{CV} = 0.959, \text{RMSE} = 0.177. \end{aligned}$$

Here, N is the number of compounds, R is the regression coefficient, R<sup>2</sup> is the coefficient of determination, R<sup>2</sup><sub>A</sub> is the adjusted coefficient of determination, R<sup>2</sup><sub>CV</sub> is the cross validation coefficient of determination, and RMSE is the root-mean square error.

##### MLR regression model for antagonist ligands

$$\begin{aligned} \log K_d = & 2.471 (\pm 0.187) - 9.481 (\pm 1.182) \text{GGI10} \\ & - 1.828 (\pm 0.469) \text{MATS3p} \end{aligned} \quad (2)$$

$N = 16$ ,  $R = 0.973$ ,  $R^2 = 0.946$ ,  $R^2_A = 0.938$ ,  
 $S = 0.225$ ,  $R^2_{CV} = 0.943$ ,  $RMSE = 0.204$ .

#### MLR regression model for agonist ligands

$$\begin{aligned} \log K_d = & 3.551 (\pm 0.490) + 0.812 (\pm 0.204) \text{ C-042} \\ & - 0.816 (\pm 0.570) \text{ MATS8v} \\ & - 0.686 (\pm 0.150) \text{ C-040} - 0.644 (\pm 0.185) \text{ C-041} \\ & - 27.475 (\pm 7.193) \text{ JG14} \end{aligned} \quad (3)$$

$N = 33$ ,  $R = 0.977$ ,  $R^2 = 0.954$ ,  $R^2_A = 0.946$ ,  $S = 0.193$ ,  $R^2_{CV} = 0.952$ ,  $RMSE = 0.175$ .

Equation (1) shows that the most significant descriptor of the experimental  $\log K_d$  for both agonist and antagonist ligands is the 2D autocorrelation descriptor ATS4e, where  $\log K_d$  is inversely proportional to ATS4e. Other significant descriptors are MATS3p (2D autocorrelation descriptor) and the aromaticity index (AROM), which increases as  $\log K_d$  decreases.

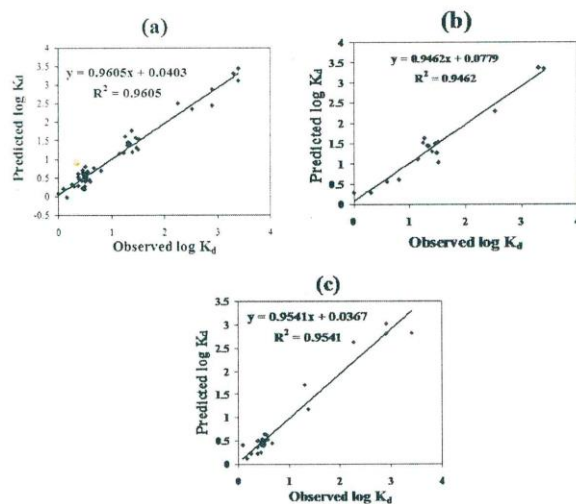
Equation (2) shows that the most significant descriptor for the antagonist ligands is the Galvez topological charge index of order 10 (GGI10), while equation (3) shows that the most significant descriptor for the agonist ligands is the Galvez mean topological charge index of order 4. The regression models described in equations (1)-(3)

have comparable regression and cross validation parameters. However, the RMSE for the regression model of antagonist ligands (0.204) is higher than those for other two models described in equations (1) and (3), where the RMSE = 0.177 and 0.175, respectively. Additionally, for equation (2), the value of  $R^2_{CV} = 0.943$  is lower than those for equations (1) and (3), where  $R^2_{CV} = 0.959$  and 0.952, respectively. The cross validation of parameters indicates that the regression models obtained for the whole data set (consisting of both agonist and antagonist ligands) is comparable to the regression model obtained for the agonist ligands. However, the regression models described in equations (1) and (3) are slightly better than the model described in equation (2). The predicted and observed  $\log K_d$  for the regression models described in equations (1)-(3) are shown in Figure 8.

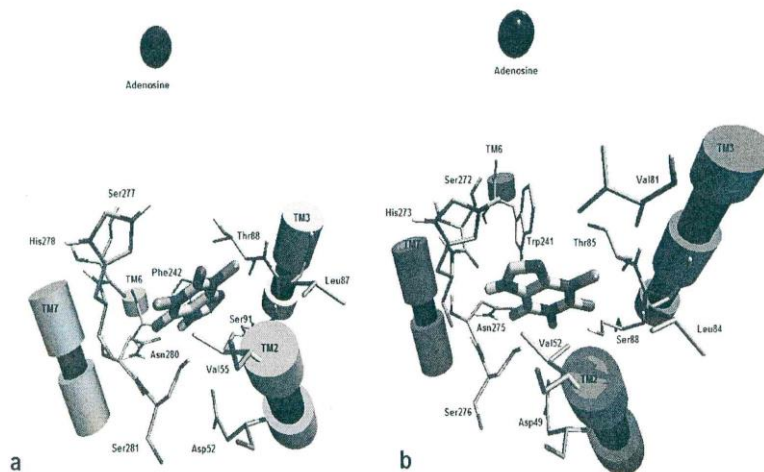
As shown in the QSAR results, steric and charge factors in ligands are strongly related to the experimental calculated affinity for ligands. This supports the requirement of singular hindrance effects for ligands in  $A_{2A}$ R recognition, and also it supports the idea that differences could be expected between caffeine and ligands with smaller hindrance effects.

**Table 4.** Summary of descriptors.

Descriptor name	Description
Mor20u	3D-MoRSE - signal 20/unweighted
MATS3p	Moran autocorrelation - lag 3/weighted by atomic polarizabilities
Mor25u	3D-MoRSE - signal 25/unweighted
C-042	corresponds to X—CH...X (among atom centered fragments descriptors)
ATS4e	Broto-Moreau autocorrelation of a topological structure - lag 4/weighted by atomic Sanderson electronegativities
GGI4	Galvez topological charge index of order 4
BEHm7	highest eigenvalue n. 7 of Burden matrix/weighted by atomic masses
AROM	Aromaticity
MATS8v	Moran autocorrelation - lag 8/weighted by atomic van der Waals volumes
GGI10	Galvez topological charge index of order 10
C-010	atom centered fragment CHX3
C-041	atom centered fragment X-C(+X)-X
C-042	atom centered fragment X—CH..X
JG14	Galvez mean topological charge index of order 4



**Figure 8.** Predicted versus observed log K<sub>d</sub> for (a) both agonist and antagonist ligands, (b) agonist ligands and (c) antagonist ligands.



**Supplementary Figure 1.** Binding site on (a) hA<sub>2A</sub>R and (b) rA<sub>2A</sub>R for theophylline. The core of the adenosine molecule is depicted as a black sphere. Transmembrane domains implicated are depicted as a cartoon marking the segments with amino acids interacting with theophylline. These amino acids are labeled in bond representation.



**CONCLUSION**

The theoretical results show that the ligands tested have similar binding to hA<sub>2A</sub>R and rA<sub>2A</sub>R. Additionally, the QSAR results address the importance of the xanthine core contained in A<sub>2A</sub>R ligands and the hindrance effect on the A<sub>2A</sub>R affinity. Finally, these findings suggest that the rA<sub>2A</sub>R in its inactive state can be used for testing A<sub>2A</sub>R antagonists, but it cannot be used to test agonists despite being submitted to MD simulations. The rA<sub>2A</sub>R model exhibits the best relationship with antagonists even though the adenosine agonist reaches the reported His273 via hydrogen bond interactions.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

We are grateful for the scholarships and financial support from CONACYT, México (132353), ICYTDF (PIRIVI09-9), COFAA and SIP-IPN (20110786), PAPIIT-DGAPA UNAM-215708 and Posgrado en Ciencias Biológicas UNAM. The authors thank the Centro Nacional de Supercomputo, México, for providing access to the "Argentum" cluster.

**REFERENCES**

- Ralevic, V. and Burnstock, G. 1998, *Rev. Pharmacol.*, 50, 413.
- Hernan, M. A., Takkouche, B., Caamaño-Isorna, F. and Gestal-Otero, J. 2002, *Ann. Neurol.*, 52, 276.
- Tuccinardi, T., Ortore, G., Manera, C., Saccomanni, G. and Martinelli, A. 2006, *Eur. J. Med. Chem.*, 41, 321.
- Hillion, J., Canals, M., Torvinen, M., Cadado, V., Scott, R., Terasmaa, A., Hansson, A., Watson, S., Olah, M. E., Mallol, J., Canela, E. I., Zoli, M., Agnati, L. F., Ibanez, C. F., Lluís, C., Franco, R., Ferre, S. and Fuxe, K. 2002, *J. Biol. Chem.*, 277, 18091.
- Mihara, T., Mihara, K., Yarimizu, J., Mitani, Y., Matsuda, R., Yamamoto, H., Akahane, A., Iwashita, A. and Matsuoka, N. J. 2007, *Pharm. Exp. Ther.*, 323, 708.
- Mingote, S., Font, L., Farrar, A. M., Vontell, R., Worden, L. T., Stopper, C. M., Port, R., Sink, K. S., Bunce, J. G., Chrobak, J. J. and Salamone, J. D. 2008, *J. Neuroscience*, 28, 9037.
- Simola, N., Morelli, M. and Pinna, A. 2008, *Curr. Pharm. Des.*, 14, 1475.
- Yuzlenko, O. and Kiec-Kononowicz, K. 2009, *J. Comput. Chem.*, 30, 14.
- Xu, F., Wu, H., Katritch, V., Han, G. W., Jacobson, K. A., Gao, Z. G., Cherezov, V. and Stevens, R. C. 2011, *Science*, 332, 322.
- Jaakola, V. P., Griffith, M. T., Hanson, M. A., Cherezov, V., Chien, E. Y., Lane, J. R., Ijzerman, A. P. and Stevens, R. C. 2008, *Science*, 322, 1211.
- Mustafi, D. and Palcewski, K. 2009, *Mol. Pharmacol.*, 75, 1.
- Ivanov, A. A., Barak, D. and Jacobson, K. A. 2009, *J. Med. Chem.*, 52, 3284.
- Yuzlenko, O. and Kiec-Kononowicz, K. 2009, *J. Comput. Chem.*, 30, 14.
- Cristalli, G., Lambertucci, C., Marucci, G., Volpini, R. and Dal-Ben, D. 2008, *Curr. Pharm. Des.*, 14, 1525.
- Volpini, R., Dal Ben, D., Lambertucci, C., Marucci, G., Mishra, R. C., Ramadori, A. T., Klotz, K. N., Trincavelli, M. L., Martini, C. and Cristalli, G. 2009, *Chem. Med. Chem.*, 4, 1010.
- Kull, B., Arslan, G., Nilsson, C., Owman, C., Lorenzen, A., Schwabe, U. and Fredholm, B. B. 1999, *Biochem. Pharmacol.*, 57, 65.
- González, M. P., Terán, C., Teijeira, M. and Helguera, A. M. 2006, *Eur. J. Med. Chem.*, 41, 56.
- Jankovic, J. 2008, *Ann. Neurol.*, 63, 267.
- Jaakola, V. P., Lane, J. R., Lin, J. Y., Katritch, V., Ijzerman, A. P. and Stevens, R. C. 2010, *J. Biol. Chem.*, 285, 13032.
- Holschbach, M. H., Bier, D., Stüsgen, S., Wutz, W., Sihver, W., Coenen, H. H. and Olsson, R. A. 2006, *Eur. J. Med. Chem.*, 41, 7-15.
- Frisch, M. J., Trucks, J. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Robb, Cheeseman, J. R., Zakrzewski, V. G., Montgomery, J. A. Jr., Stratmann, R. E., Burant, J. C., Dapprich, S., Millam, J. M., Daniels, A. D., Kudin, K. N., Strain, M. C., Farkas, O., Tomasi, J., Barone, V., Cossi, M., Cammi, R., Mennucci, B., Pomelli, C.,

- Adamo, C., Clifford, S., Ochterski, J., Peterson, G. A., Ayala, P. Y., Cui, Q., Morokuma, K., Malick, D. K., Rabuck, A. D., Raghavachari, K., Foresman, J. B., Cioslowski, J., Ortiz, J. V., Baboul, A. G., Stefanov, B. B., Liu, G., Liashenko, A., Piskorz, P., Komaromi, I., Gomperts, R., Martin, R. L., Fox, D. J., Keith, T., Al-Laham, M. A., Peng, C. Y., Nanayakkara, A., Challacombe, M., Gill, P. M. W., Johnson, B., Chen, W., Wong, M. W., Andres, J. L., Gonzalez, C., Head-Gordon, M., Replogle, E. S. and Pople, J. A. 1998, Gaussian 98, Revision A.9, Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA.
22. Chern, Y., King, K., Lai, H. L. and Lai, H. T. 1992, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 185, 304.
23. Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J. and Schwede, T. 2006, *Bioinformatics*, 22, 195.
24. Schwede, T., Kopp, J., Guex, N. and Peitsch, M. C. 2003, *Nucl. Acids Res.*, 31, 3381.
25. Guex, N. and Peitsch, M. C. 1997, *Electrophoresis*, 18, 2714.
26. Zhang, Y. and Skolnick, J. 2004, *Proteins*, 57, 702.
27. Zhang, Y. and Skolnick, J. 2005, *Nucl. Acids Res.*, 33, 2302.
28. Lovell, S. C., Davis, I. W., de Bakker, P. I., Word, J. M., Prisant, M. G., Richardson, J. S. and Richardson, D. C. 2003, *Proteins*, 50, 437.
29. van der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E. and Berendsen, H. J. C. 2005, *J. Comput. Chem.*, 26, 1701.
30. Kandt, C., Ash, W. L. and Tieleman, D. P. 2007, *Methods*, 41, 475.
31. Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H. J. C. and Fraaije, J. G. E. M. 1997, *J. Comput. Chem.*, 18, 1463.
32. Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., Gunsteren, W. F., Dinola, A. and Haak, J. R. 1984, *J. Chem. Phys.*, 81, 3684.
33. Berger, O., Edholm, O. and Jahnig, F. 1997, *Biophys. J.*, 72, 2002.
34. Patra, M., Karttunen, M., Hyvönen, M. T., Falck, E., Lindqvist, P. and Vattulainen, I. 2003, *Biophys. J.*, 84, 3636.
35. Melo, F., Devos, D., Depiereux, E. and Feytmans, E. 1997, *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.*, 5, 187.
36. Wiederstein, M. and Sippl, M. J. 2007, *Nucleic Acids Res.*, 35, W407.
37. Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K. and Olson, A. 1998, *J. Comp. Chem.*, 19, 1639.
38. Huey, R., Morris, G. M., Olson, A. J. and Goodsell, D. S. 2007, *J. Comp. Chem.*, 28, 1145.
39. Ballesteros, J. A. and Weinstein, H. Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. 1995, In *Receptor Molecular Biology*, Sealfon, S. C. (Ed.) Academic Press, 366.
40. Fatakia, S. N., Costanzi, S. and Chow, C. C. 2009, *PLoS One*, 4, e4681.
41. Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K. 1996, *J. Mol. Graph.*, 14, 33.
42. Deeb, O., Rosales-Hernández, M. C., Gómez-Castro, C. Garduño-Juárez, R. and Correa-Basurto, J. 2010, *Biopolymers*, 93, 161.
43. Cristalli, G., Lambertucci, C., Taffi, S., Vittori, S. and Volpini, R. 2003, *Curr. Top. Med. Chem.*, 3, 387.
44. Kim, S. K., Gao, Z. G., Van Rompaey, P., Gross, A. S., Chen, A., Van Calenbergh, S. and Jacobson, K. A. 2003, *J. Med. Chem.*, 46, 4847.
45. Grossfield, A. 2011, *Biochim. Biophys. Acta*, 1808, 1868.
46. Simpson, L. M., Wall, I. D., Blaney, F. E. and Reynolds, C. A. 2011, *Proteins*, 79, 1441.
47. Provasi, D. and Filizola, M. 2010, *Biophys. J.*, 98, 2347.
48. Khafizov, K., Lattanzi, G. and Carloni, P. 2009, *Proteins*, 75, 919-930.
49. Rodríguez, D., Piñeiro, Á. and Gutiérrez-de-Terán, H. 2001, *Biochemistry*, 50, 4194.

- 
50. Nygaard, R., Frimurer, T. M., Holst, B., Rosenkilde, M. M. and Schwartz, T. W. 2009, *Trends Pharmacol. Sci.*, 30, 249.
  51. Tan, L. C., Koh, W. P., Yuan, J. M., Wang, R., Au, W. L., Tan, J. H., Tan, E. K., and Yu, M. C. 2008, *Am. J. Epidemiol.*, 167, 553.
  52. Barranco-Quintana, J. L., Allam, M. F., Del Castillo, A. S. and Navajas, R. F. 2009, *J. Am. Coll. Nutr.*, 28, 1.
  53. Yu, G., Maskray, V., Jackson, S. H., Swift, C. G. and Tiplady, B. 1991, *Br J Clin. Pharmacol.*, 32, 341.
  54. Hannila, S. S. and Filbin, M. T. 2008, *Exp. Neurol.*, 209, 321.
  55. Genders, A. J., Bradley, E. A., Rattigan, S. and Richards, S. M. 2011, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 301, E342.
  56. Soriano-Ursúa, M. A., Trujillo-Ferrara, J. G. and Correa-Basurto, J. 2010, *J. Med. Chem.*, 53, 923.