



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**MODULACIÓN DE LA CORRIENTE DE CALCIO MEDIADA POR LA  
ACTIVACIÓN SECUENCIAL DE LOS RECEPTORES  
PURINÉRGICOS TIPO A<sub>1</sub> Y A<sub>2A</sub> EN NEURONAS ESPINOSAS  
MEDIANAS DE RATA.**

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL TITULO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**OMAR HERNÁNDEZ GONZÁLEZ**

**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. JOSÉ BARGAS DÍAZ, INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM**

**MIEMBROS DE COMITÉ TUTOR  
DRA. ELVIRA GALARRAGA PALACIO, INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM  
DR. FERNANDO PEÑA ORTEGA, INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM**

**MEXICO D.F FEBRERO 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

El presente trabajo se realizó en el departamento de Biofísica del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. José Bargas Díaz.

A lo largo del Doctorado conté con beca del: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

El presente proyecto fue financiado por:  
El programa IMPULSA-UNAM 03. El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el donativo 154131 y 98004 asignado al Dr. J. Bargas y a la Dra. E. Galarraga.  
La Dirección General de Asuntos del Personal Académico (UNAM) asignado al Dr. J. Bargas  
Y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-Deutsche Forschungsgemeinschaft (CONACyT-DFG) con el donativo I0110/193/10 FON.INST.-29-10 asignado al Dr. J. Bargas.

## DEDICATORIA.

LA PRESENTE TESIS LA DEDICO PRINCIPALMENTE A MI HERMOSA FAMILIA CONFORMADA POR MI ESPOSA ARELI ELIZABETH RANCAÑO CAMACHO, YA QUE SU APOYO INCONDICIONAL Y SACRIFICIO DE TODOS LOS DIAS ME HACEN QUERER SER UNA MEJOR PERSONA Y POR TI Y PARA MIS HIJOS; NATAHAN Y MI "PHIA BABETH" (SOPHIA ELIZABETH) DOY LO MEJOR DE MI YA QUE SON MIS MOTORES DE TODOS LOS DIAS Y ELLOS ME HAN DADO LAS MEJORES LECCIONES DE VIDA QUE NO SE APRENDEN EN UN ARTICULO.

DEDICO ESTA TESIS EN ESPECIAL A MIS PADRES PEDRO HERNÁNDEZ ZUÑIGA Y NICOLASA GONZÁLEZ RESENDIZ, POR SUS SABIAS ENSEÑANZAS EL PRESENTE TITULO SE HIZO REALIDAD. AUNQUE NO ENTIENDAN MUCHO DE LO QUE ME DEDICO, SABEN COMO ESTIMULARME PARA PODER LOGRAR MIS OBJETIVOS.

A MI HERMANO PEDRO QUE AUNQUE NO SOMOS EL GRAN EJEMPLO DE HERMANOS SIEMPRE ESTAMOS EL UNO PARA EL OTRO.

## AGRADECIMIENTOS

A la UNAM que desde hace 15 años es mi casa académica.

Al Dr. José Bargas Díaz, por aceptarme en su laboratorio y comprometerse en mi formación académica y solo resta decir, “GRACIAS” Dr Bargas.

A mi comité tutorial; Dra. Elvira Galarraga Palacio y Dr Fernando Peña, gracias por sus aportaciones y valiosos comentarios que ayudaron en mi formación académica.

A los sinodales; Froylan Gómez Laguna, Oscar Prospero García, Juan Carlos Gómora Martínez y Benjamín Floran Garduño, por los comentarios realizados a la presente Tesis.

A Antonio Laville, Dagoberto Tápia, Xochitl Ayala por su amistad y su apoyo dentro y fuera del laboratorio, Gracias.

A mis amigos de la Licenciatura y Posgrado, agradecer a cada uno de ustedes llevaría más de una página de la presente tesis por ello solo dire “GRACIAS” a todos ustedes que han compartido conmigo este proceso y por supuesto saben que se les aprecia.

A mis familiares “GRACIAS” por estar en los momentos que los he necesitado. Y los que ya no estan espero se sientan orgullosos de este logro tan importante.

# ÍNDICE

**ABREVIACIONES**

**RESUMEN**

**SUMMARY**

## **1. INTRODUCCIÓN**

1.1 GANGLIOS BASALES

1.2 RECEPTORES DE DOPAMINA

1.3 RECEPTORES DE ADENOSINA

1.4 CANALES DE  $Ca^{2+}$

1.5 ENFERMEDAD DE PARKINSON

## **2. JUSTIFICACION**

## **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

## **4. OBJETIVO**

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

## **5. HIPÓTESIS**

## **6. MÉTODOS**

6.1. OBTENCIÓN DE NEURONAS Y FIJACIÓN DE VOLTAJE.

6.2. FIJACIÓN DE CORRIENTE.

## **7. RESULTADOS**

## **8. DISCUSIÓN**

## **9. CONCLUSIONES**

## **10. REFERENCIAS**

## **11. ANEXO I**

## ABREVIACIONES

|                                    |  |
|------------------------------------|--|
| <b>5'-NT</b>                       | 5'-nucleotidasa  |
| <b>A<sub>1</sub>:</b>              | Receptor de adenosina A <sub>1</sub>                           |
| <b>A<sub>2A</sub>:</b>             | Receptor de adenosina A <sub>2A</sub>                          |
| <b>A<sub>2B</sub>:</b>             | Receptor de adenosina A <sub>2B</sub>                          |
| <b>A<sub>3</sub>:</b>              | Receptor de adenosina A <sub>3</sub>                           |
| <b>AC:</b>                         | Adenilato ciclasa  |
| <b>ADA:</b>                        | Adenosina desaminasa   |
| <b>Akt:</b>                        | Serina-treonina kinasa   |
| <b>CaM:</b>                        | Calmodulina  |
| <b>CaMKII:</b>                     | Proteína quinasa II regulada por Ca <sup>2+</sup> /calmodulina |
| <b>CCDV:</b>                       | Canales de calcio dependientes de voltaje                      |
| <b>CNT :</b>                       | Transportadores de nucleosidos concentrativos                  |
| <b>DA:</b>                         | Dopamina   |
| <b>DAG:</b>                        | Diacilglicerol   |
| <b>DHP:</b>                        | Dihidropiridinas   |
| <b>ecto-ADA</b>                    | ecto-adenosina desaminasa                                      |
| <b>ENT :</b>                       | transportadores de nucleosidos transportadores: equilibrativos |
| <b>EP:</b>                         | Enfermedad de Parkinson  |
| <b>GB:</b>                         | Ganglios basales   |
| <b>HVA:</b>                        | Activados a voltajes "elevados"                                |
| <b>I<sub>Ca</sub><sup>2+</sup></b> | Corrientes de Calcio   |
| <b>IP<sub>3</sub>:</b>             | Inositol trifosfato  |
| <b>LVA:</b>                        | Activados a "bajos" voltajes                                   |
| <b>NEMs:</b>                       | Neuronas espinosas medianas                                    |
| <b>NSt:</b>                        | Neostriado   |
| <b>NSTr:</b>                       | Transportadores de nucleosidos                                 |
| <b>PA:</b>                         | Potencial de acción  |
| <b>PI3K:</b>                       | Fosfatidilinositol 3-kinasa                                    |
| <b>PKA:</b>                        | Proteína quinasa A   |
| <b>PKC:</b>                        | Proteína quinasa C   |
| <b>PLC:</b>                        | Fosfolipasa C  |
| <b>PP-2A:</b>                      | Proteína fosfatasa- 2A   |
| <b>PP-2B:</b>                      | Proteína fosfatasa 2B  |
| <b>PPH:</b>                        | Pospotencial hiperpolarizante                                  |
| <b>PTX:</b>                        | <i>Toxina Pertussis</i>  |
| <b>PTX:</b>                        | <i>Toxina Pertussis</i>  |
| <b>SAH</b>                         | S-adenosilhomocisteína   |
| <b>SAHH</b>                        | S-adenosilhomocisteína hidrolasa                               |
| <b>SNc:</b>                        | Sustancia negra compacta                                       |
| <b>SNr:</b>                        | Sustancia negra reticulada                                     |

## RESUMEN

Los receptores de dopamina de las clases  $D_1$  y  $D_2$  se encuentran localizados en las neuronas espinosas medianas (NEMs) de proyección del neo-estriado (NStr). El receptor  $D_2$  se encuentra en las de la vía directa e indirecta (dNEMs e iNEMs) mientras que el receptor  $D_1$  se localiza en las neuronas de la vía directa. En comparación, los receptores de adenosina del tipo  $A_1$  se encuentran en las dos poblaciones neuronales (dNEMs e iNEMs), mientras que los receptores de adenosina del tipo  $A_{2A}$  sólo se expresan en las neuronas de la vía indirecta. Debido a la importancia de las corrientes de calcio sobre la excitabilidad de estas neuronas, en este trabajo lo usamos como efectores finales para evaluar la función de las cascadas de señalización que estos receptores activan. Por ejemplo, entre muchas otras acciones el receptor a dopamina,  $D_1$ , incrementa la excitabilidad neuronal mientras que los receptores a dopamina  $D_2$  la decrementan. Ambas acciones se logran afectando varias vías, pero la primera en ser descubierta no deja de tener importancia, la de incrementar o reducir, respectivamente, la entrada de calcio por los canales  $Ca_v1$  (L). En el caso de la señalización purinérgica, las acciones de los receptores  $A_1$  y  $A_{2A}$  sobre las corrientes de calcio de las NEMs no habían sido estudiadas, por lo que en este estudio nos propusimos hacerlo. Nuestra hipótesis inicial fue que los receptores a adenosina tipo  $A_1$  reducen la corriente de calcio en ambos tipos de NEMs ya que se ha demostrado que están acoplados a una proteína  $G_i$  al igual que los receptores de dopamina tipo  $D_2$  e inhiben a la adenilato ciclasa (AC), y por otro lado, los receptores a adenosina de tipo  $A_{2A}$  incrementarían la  $I_{Ca^{2+}}$  exclusivamente en las neuronas de la vía indirecta ya que estos están acoplados



a una proteína  $G_s$  y activan a la AC, al igual que los receptores tipo D1. Sin embargo, describimos varias acciones inesperadas; para observar el efecto de incremento de la corriente de calcio los receptores purinérgicos deben activarse de manera secuencial: primero el receptor  $A_1$  y después el  $A_{2A}$ . Además los canales de calcio involucrados en sus acciones resultaron ser diferentes:  $Ca_v2$  para el caso del receptor  $A_1$  decrementando la entrada de calcio, y  $Ca_v1$  para el caso del receptor  $A_{2A}$ , incrementando la entrada de calcio. Por lo tanto, la acción de los receptores purinérgicos reconfigura la composición de canales de calcio de las iNEMs, explicando, en parte, porque son más excitables que las dNEMs.

## SUMMARY

D<sub>1</sub>- and D<sub>2</sub>-types of dopamine receptors are located separately in direct and indirect pathway striatal projection neurons (dSPNs and iSPNs). In comparison, adenosine A<sub>1</sub>-type receptors are located in both neuron classes and adenosine A<sub>2A</sub>-type receptors show a preferential expression in iSPNs. Due to their importance for neuronal excitability, Ca<sup>2+</sup>-currents have been used as final effectors to see the function of signaling cascades associated with different G protein-coupled receptors. For example, among many other actions, D<sub>1</sub>-type receptors increase, while D<sub>2</sub>-type receptors decrease neuronal excitability by either enhancing or reducing, respectively, Ca<sub>v1</sub> Ca<sup>2+</sup>-currents. These actions occur separately in dSPNs and iSPNs. In the case of purinergic signaling, the actions of A<sub>1</sub>- and A<sub>2A</sub>-receptors have not been compared observing their actions on Ca<sup>2+</sup>-channels of SPNs as final effectors. Our hypotheses are that modulation of Ca<sup>2+</sup>-currents by A<sub>1</sub>-receptors occurs in both dSPNs and iSPNs. In contrast, iSPNs would exhibit modulation by both A<sub>1</sub>- and A<sub>2A</sub>-receptors. We demonstrate that A<sub>1</sub>-type receptors reduced Ca<sup>2+</sup>-currents in all SPNs tested. However, A<sub>2A</sub>-type receptors enhanced Ca<sup>2+</sup>-currents only in half tested neurons. Intriguingly, to observe the actions of A<sub>2A</sub>-type receptors, occupation of A<sub>1</sub>-type receptors had to occur first. However, A<sub>1</sub>-receptors decreased Ca<sub>v2</sub> Ca<sup>2+</sup>-currents, while A<sub>2A</sub>-type receptors enhanced current through Ca<sub>v1</sub> channels. Because these channels have opposing actions on cell discharge, these differences explain in part why iSPNs may be more excitable than dSPNs. It is demonstrated that intrinsic voltage-gated currents expressed in SPNs are effectors of purinergic signaling that therefore play a role in excitability.

## 1.-INTRODUCCION

### 1.1. GANGLIOS BASALES

Los Ganglios Basales (GB) son circuitos neuronales subcorticales localizados en el telencéfalo de los vertebrados están encargados de implementar la memoria de procedimientos, las rutinas motoras tales como la secuencia de movimientos necesaria para manejar un coche o tocar el piano, así como la organización de los movimientos dirigidos a alcanzar metas después de la toma de decisiones (Cools, 1984; Takakusaki et al., 2004; Grillner et al., 2005; Yin y Knowlton, 2006; Graybiel 2008).

En los roedores, los GB están conformados por el neostriado (NSt), el núcleo subtalámico (NST), el globo pálido externo (GPe), el núcleo entopenduncular ó globo pálido interno (GPi), la sustancia nigra reticulata (SNr), y la sustancia nigra compacta (SNc). El NSt y el NST reciben proyecciones excitadoras glutamatérgicas provenientes de la corteza cerebral y del tálamo las cuales generan los mecanismos para la toma de decisiones y la selección de acciones (Redgrave et al., 2011; Stephenson-Jones et al., 2011). Así, el NSt y el STN forman los dos núcleos de entrada a los GB (Albin et al., 1989; Smith et al., 1998). Los núcleos de salida de los ganglios basales están conformados por el GPi y la SNr, ambos son de naturaleza inhibitoria y se encuentran tónicamente activos, estos proyectan hacia el tálamo y de ahí a las cortezas motoras y premotoras; también proyectan al tallo cerebral: colículo superior (CS), núcleos pedúnculo pontinos (PPN), y la región locomotora mesencefálica (MLR) (Albin et al., 1989; Mink., 1996; Smith et al., 1998; Boraud et al., 2002; Takakusaki et al., 2003, 2004; Figura 1).

El NSt está conformado por las neuronas de proyección denominadas neuronas espinosas medianas (NEMs) y son las más abundantes (90-95% de la población neuronal total en roedores) (Nicola et al., 2000; Wichmann y DeLong., 2003). Estas neuronas son de naturaleza GABAérgica y se caracterizan por tener un diámetro somático de 10-20  $\mu\text{m}$  (Wilson y Groves., 1980), sus dendritas poseen gran cantidad de espinas y su axón principal deja abundantes colaterales axónicas dentro del NSt previo a su salida hacia otros núcleos de los GB (Kawaguchi et al., 1990). Las NEM's pueden separarse en dos poblaciones dependiendo de la proyección de sus axones hacia los núcleos de salida; una población de estas proyecta de forma directa a los núcleos de salida: GPi y SNr por lo que se le denomina "vía directa" y la segunda población da origen a una vía polisináptica proyectando hacia los núcleos intrínsecos de los GB (GPe y el STN) y luego proyectan a los núcleos de salida (GPi y a la SNr) por lo que a esta vía se le llama "vía indirecta" (Gerfen et al., 1990; Figura 1).

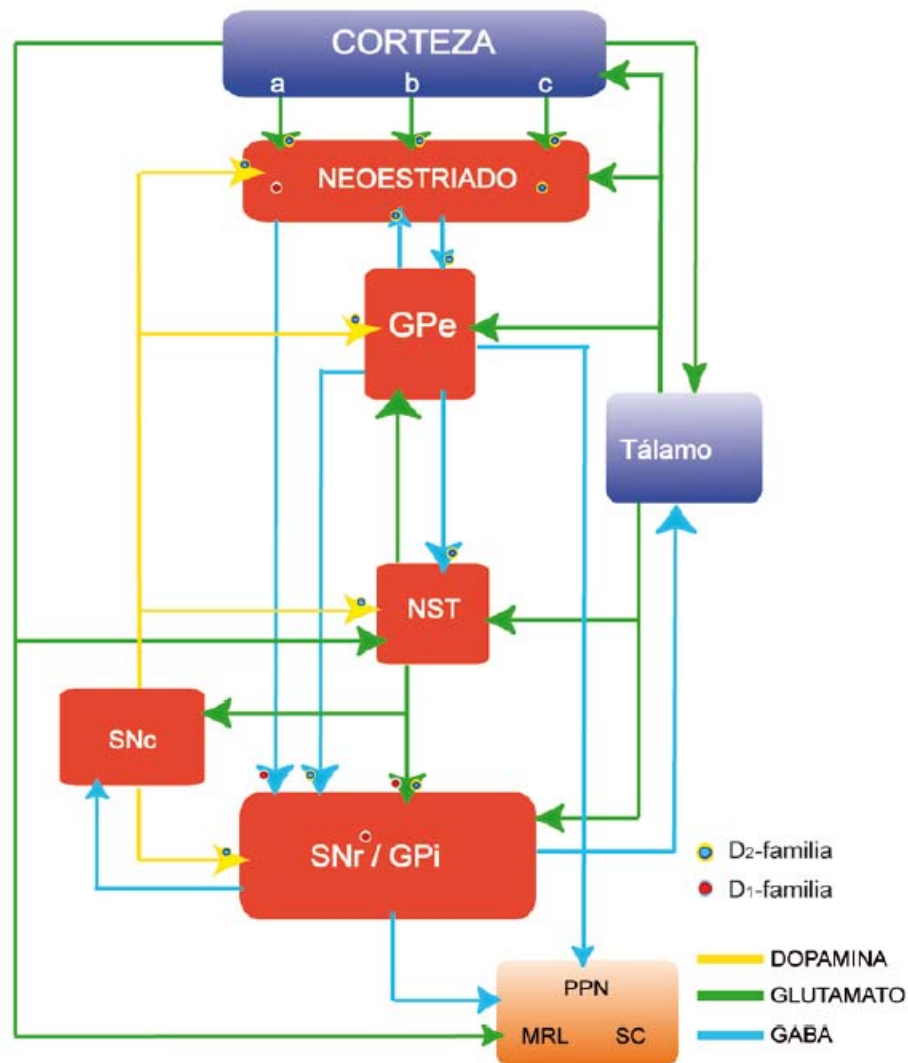
Esta división de la población del NSt se relaciona con los péptidos y los tipos de receptor a dopamina (DA) y adenosina (AD) que expresan: las neuronas de la vía directa expresan sustancia P y dinorfina además de los receptores a dopamina del tipo  $D_1$  y a adenosina del tipo  $A_1$ . Las neuronas de la vía indirecta expresan encefalinas además de los receptores a dopamina del tipo  $D_2$  y de adenosina de los tipos  $A_1$  y  $A_{2A}$ . (Alexander y Crutcher, 1990; Gerfen et al., 1990; Yabuuchi et al 2006; Schiffmann et al., 2007; Ferré et al., 2007; Fuxe et al., 2007). Por tal motivo se pueden distinguir funcionalmente.

Funcionalmente al activarse las neuronas de la vía directa, la proyección inhibitoria de las neuronas del NSt lleva a la inhibición de los núcleos de salida,

las cuales se encuentran tónicamente activas, por lo tanto disminuyen su disparo. Pero como esta salida tónica y es también inhibidora de sus núcleos blanco (los circuitos tálamo-corticales y el tallo cerebral) la inhibición estriatal lo que hace es remover la inhibición de estos blancos; donde la doble inhibición lleva a un incremento en la actividad de las cortezas motoras y el tallo y por ello, facilita el movimiento.

Por el otro lado, cuando se activan las neuronas de la vía indirecta pueden pasar varias cosas: tal como las neuronas de salida las neuronas del GPe disparan tónica o irregularmente y uno de sus blancos es el NST y este último posee neuronas excitadoras que también disparan tónicamente. Por un lado, éstas proyectan a los núcleos de salida, GPi y SNr, manteniéndolos activos. Esta acción es contraria a la de la vía directa que los inhibe (ver arriba), por lo que se tendería a reprimir la ejecución de movimientos. Pero el NST también excita al GPe, lo que forma un asa de inhibición-excitación entre los dos que puede formar un oscilador que genere ráfagas de baja frecuencia. Como ambos GPe y STN proyectan a los núcleos de salida estas oscilaciones pueden propagarse a los mismos (Alexander et al, 1986; Albin et al, 1989; Figura 1). Se sabe que tanto la excitación de los núcleos de salida por el STN como el enganche de sus neuronas en ritmos oscilatorios lentos producen acinesia o disminución de los movimientos.

En resumen la vía directa tiende a activar los movimientos y la vía indirecta a inhibirlos. Se supone que un adecuado equilibrio dinámico entre estas dos vías produce los movimientos dirigidos, el tono muscular y la postura.



**Figura 1. Esquema de los Ganglios Basales.** Los ganglios basales (GB; rojo) están compuestos por dos núcleos de entrada que reciben las aferentes de la corteza y el tálamo; el neostriado (NST) y el subtalamo (NST). Los GB tienen dos núcleos de salida; sustancia nigra reticulata (SNr) y el globo pálido en su parte interna (GPi) el procesamiento de la información que viene de la corteza/ y el tálamo hacia los núcleos de salida de los GB ocurre en parte por dos vías paralelas denominadas vía directa que va del NST hacia los núcleos de salida y otra vía denominada indirecta que va hacia los núcleos intermedios GPe y NST que a su vez van hacia los núcleos de salida. Otras vías son posibles pero no se describen aquí.

Sin embargo estos circuitos se encuentran modulados por neurotransmisores o neuromoduladores, entre los que se encuentra la dopamina (DA). Ésta es esencial para el funcionamiento del cerebro de los vertebrados. Además de

regular los movimientos motores voluntarios y la locomoción, modula una gran variedad de funciones incluyendo, el reforzamiento conductual, la sensación de recompensa después de la ejecución de una tarea, el aprendizaje, la memoria, la cognición, las respuestas emotivas, la reacción y la adaptación ante los cambios o ante estímulos imprevistos o “salientes”. Asimismo es necesaria para explicar las adicciones y la dependencia a las drogas (Baik et al., 1995; Missale et al., 1998; Schultz., 1998; Greengard et al., 1999; Geengard., 2001; Lubow., 2005; Salamone et al., 2005; Tobler et al. 2005).

## 1.2. RECEPTORES DE DOPAMINA

Los receptores a DA pertenecen a la superfamilia de receptores de siete dominios transmembranales que transducen sus señales a través de proteínas G (GPCRs, *G protein coupled receptors*; Missale et al., 1998). Keabian y Calne en 1979 clasificaron a los receptores dopaminérgicos en dos familias: uno acoplado positivamente a la adenilato ciclasa (AC) denominado D<sub>1</sub> y otro acoplado negativamente denominado D<sub>2</sub>. Posteriormente, con la introducción de procedimientos de clonación, nuevos tipos de receptores a dopamina fueron caracterizados; estos son los D<sub>3</sub> (Sokoloff et al. 1990), D<sub>4</sub> (Van Tol et al., 1991) y D<sub>5</sub> (Sunahara et al., 1991; Tiberi et al., 1991), cuyas características fisiológicas, farmacológicas, así como su secuencia de aminoácidos, les permitían ser catalogados en alguna de las dos familias originales; la familia D<sub>1</sub> está constituida por los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>5</sub> y ambos receptores estimulan/transducen sus señales mediante la activación de proteínas G con subunidades  $\alpha$ /olf (Missale et al., 1998) que modulan positivamente a la AC y elevan la

concentración intracelular de AMPc. Mientras que la familia  $D_2$  está constituida por los receptores  $D_2$ ,  $D_3$  y  $D_4$  (Civelli et al., 1993; Missale et al., 1998; Vallone et al., 2000) y están acoplados a proteínas Gai/o, que inhiben a la AC (Stoof y Keibian., 1981) y activan a la fosfolipasa C tipo  $\beta$  ( $PLC\beta$ ).

Ambos receptores de dopamina tiene como uno de sus blancos finales modular a los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV). Las NEMs que expresan los receptores  $D_1$  pertenecen a la vía directa y facilitan la activación de los canales  $Ca_v1$  lo que aumenta su excitabilidad. Esto es, los receptores  $D_1$  activan a la vía directa y por lo tanto favorecen la ejecución de movimientos (Hernández-López et al., 1997). También facilitan a los receptores sinápticos NMDA mediante la activación de la vía de señalización AMPc-PKA/DARPP-32/PP1 (Flores-Hernández J et al., 2002).

Por otro lado la activación de los receptores de la clase  $D_2$  lleva a la inhibición de los canales de calcio  $Ca_v1$  por el complejo macromolecular dependiente de IP3 con lo cual se activa la fosfatasa PP-2A (Hernández-López et al., 2000). Esto disminuye la excitabilidad de la vía indirecta y de esta manera también disminuye la ejecución de movimientos. El consenso es que los receptores  $D_2$  tienen mayor afinidad por la dopamina, (rev. en: Dreyer., 2014) por lo que la vía indirecta está tónicamente frenada, o dinámicamente ajustada, lo que da un tono muscular y una postura adecuadas a cada situación. En cambio, los receptores  $D_1$ , con menor afinidad, sólo se activan cuando aumenta la liberación de DA, lo que activa a la vía directa de manera transitoria para ejecutar un movimiento (Dreyer., 2014).

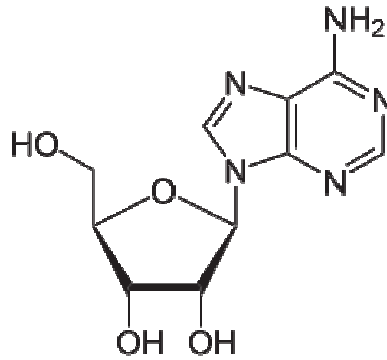


Por tales motivos los agonistas dopaminérgicos de última generación más utilizados para tratar la enfermedad de Parkinson tienen como blanco a los receptores D<sub>2</sub> (pramipexole, ropinirole, etc.), pues la hipótesis tradicional o al menos ampliamente aceptada dice que al no haber suficiente DA, la vía indirecta está sobreactivada produciendo acinesia y exceso de tono muscular o rigidez. Ambos signos se alivian con estos agonistas. El problema con el uso de estos agonistas a largo plazo producen discinesias.

Pero además de la dopamina existen otros moduladores en el cerebro que tienen acciones directas sobre las del NSt. Este trabajo se centro en uno de ellos: la adenosina. Se tiene la hipótesis que estos receptores comparten las mismas vías de señalización que los receptores de dopamina. Por ello, se piensa que pueden usarse como coadyuvantes para tratar la enfermedad de Parkinson. Nosotros quisimos poner a prueba esta hipótesis observando sus acciones sobre efectores finales de esta señalización: los canales de calcio, y por lo tanto, la excitabilidad de las NEMs.

### 1.3 RECEPTORES DE ADENOSINA

La adenosina es un nucleósido que se encuentra de forma omnipresente en el cerebro y los tejidos en general. Está formada de la unión de la adenina con un anillo de ribosa (también conocido como ribofuranosa) a través de un enlace glucosídico  $\beta$ -N<sub>9</sub>. (Figura 2). Tanto la adenosina como sus derivados son constituyentes esenciales de toda célula viva ya que conforman piezas claves para la formación de moléculas biológicas tan relevantes como los nucleótidos ATP y AMPc, cofactores como el NAD<sup>+</sup> y los ácidos nucleicos.



**Figura 2.** Estructura de la adenosina.

La adenosina y moléculas derivadas actúan como intermediarios de rutas metabólicas, también forman parte de cofactores necesarios para diversas reacciones enzimáticas tanto de oxidación-reducción como de metilación (Arch y Newsholme., 1978), tienen una función clave en el metabolismo energético, ya que conforman la principal fuente de energía celular y tienen un papel relevante como segundos mensajeros (Pull y McIlwain., 1972).

Por tales motivos la adenosina es secretada por la mayoría de las células ya que se encuentra tanto intra- como extracelularmente, sin embargo la concentración en ambos compartimentos depende de la acción de los enzimas que controlan su síntesis y degradación como la actividad de transportadores nucleosídicos de membrana (Thorn y Jarvis., 1996).

La síntesis intracelular de la adenosina ocurre por dos vías: 1) la desfosforilación de AMP por la 5'-nucleotidasa (5'-NT) y 2) la hidrólisis de S-adenosilhomocisteína (SAH) por la S-adenosilhomocisteína hidrolasa (SAHH).

La importancia de cada una de estas vías está determinada por el estado energético de la célula. En condiciones normales, la segunda vía es la principal (Lloyd y Schrader., 1989). En estados de mayor demanda energética, la

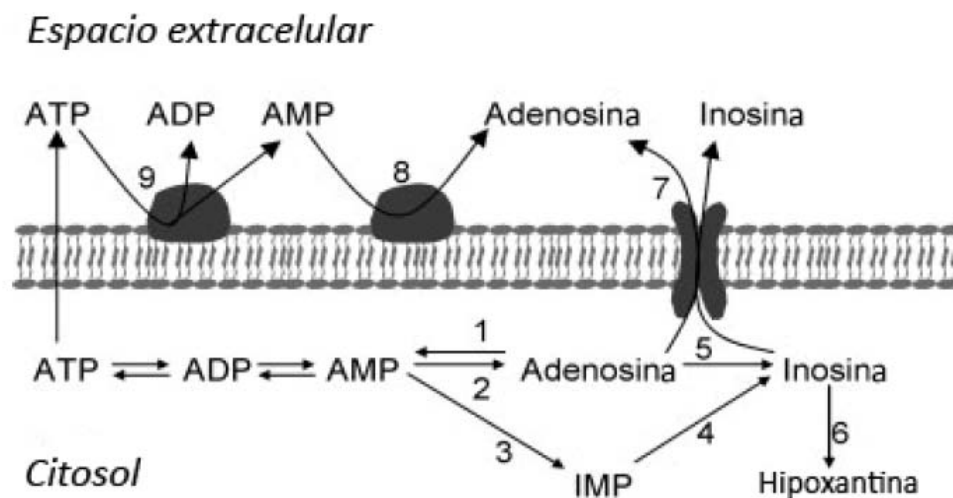
adenosina se forma rápidamente por desfosforilación consecutiva de los nucleótidos ATP, ADP y AMP con la intervención, en la etapa final, de la enzima 5'-NT citosólica (Meghji., 1993).

En el medio extracelular la producción de adenosina ocurre por la acción de diversas ectonucleotidasas que degradan el ATP, ADP, AMP y polifosfatos de diadenosina (ApnA) provenientes del interior celular mediante la desaminación a inosina por la acción de la enzima ecto-adenosina desaminasa (ecto-ADA) que se encarga de regular de la concentración extracelular de adenosina (Franco et al., 1998).

Sin embargo los reservorios extra e intracelulares de adenosina están dinámicamente regulados, no sólo por enzimas sino también por transportadores membranales de nucleosidos (NTs). Actualmente se describen dos familias de transportadores: los equilibrativos (ENT), responsables del transporte independiente de  $\text{Na}^+$  que transportan a favor del gradiente de concentración o bidireccionalmente y los concentrativos (CNT), una familia de sistemas dependiente de  $\text{Na}^+$  que transportan en contra del gradiente, del exterior hacia el interior celular (Löffler et al., 2007; Latini et al., 2001).

Los ENTs está formada por cuatro miembros ENT1, ENT2, ENT3 y ENT4, siendo ENT1 un transportador que tiene una amplia localización tisular tanto en tejidos humanos como animales (Podgorska et al., 2005). Los CNTs se encuentran asociados a tejidos especializados como intestino, riñón e hígado. Estos transportadores se han identificado en células endoteliales, aunque su contribución al transporte de nucleosidos es mínima comparados con los ENTs (Chishty et al., 2003; Archer et al., 2004).

Estos transportadores son importantes debido a que los efectos biológicos de la adenosina dependen de su concentración extracelular. Se ha descrito que en el cerebro las concentraciones basales están en el rango de 25-250 nM (Dunwiddie y Masino., 2001). Estas concentraciones fisiológicas de adenosina son suficientes para mantener una activación tónica de los receptores purinérgicos. Los niveles extracelulares de adenosina están regulados por los astrocitos (Boison et al., 2010) que expresan ambos tipos de transportadores de nucleosidos cuya función es recapturar adenosina hacia el interior y mediante fosforilación intracelular por la adenosina quinasa (AK) la adenosina se convierte en 5'-adenosin monofosfato (Figura 3).



**Figura 3. Representación esquemática de las enzimas y transportadores que regulan los niveles de adenosina.** La adenosina puede formarse a partir de AMP por acción de las 5'-nucleotidasas presentes en el citosol tipo I (2) o extracelulares (ecto 5'-nucleotidasas, 8), puede ser fosforilada por la adenosina quinasa (1) o transformarse por la adenosina desaminasa (5). Su transporte está regulado por los transportadores equilibrativos o concentrativos (7). Otras enzimas relacionadas con el metabolismo de las purinas son la AMP desaminasa (3), 5'-nucleotidasa de tipo II (4), purina nucleósido fosforilasa (6) y la apirasa (9). Modificado de Parkinson et al., 2006.

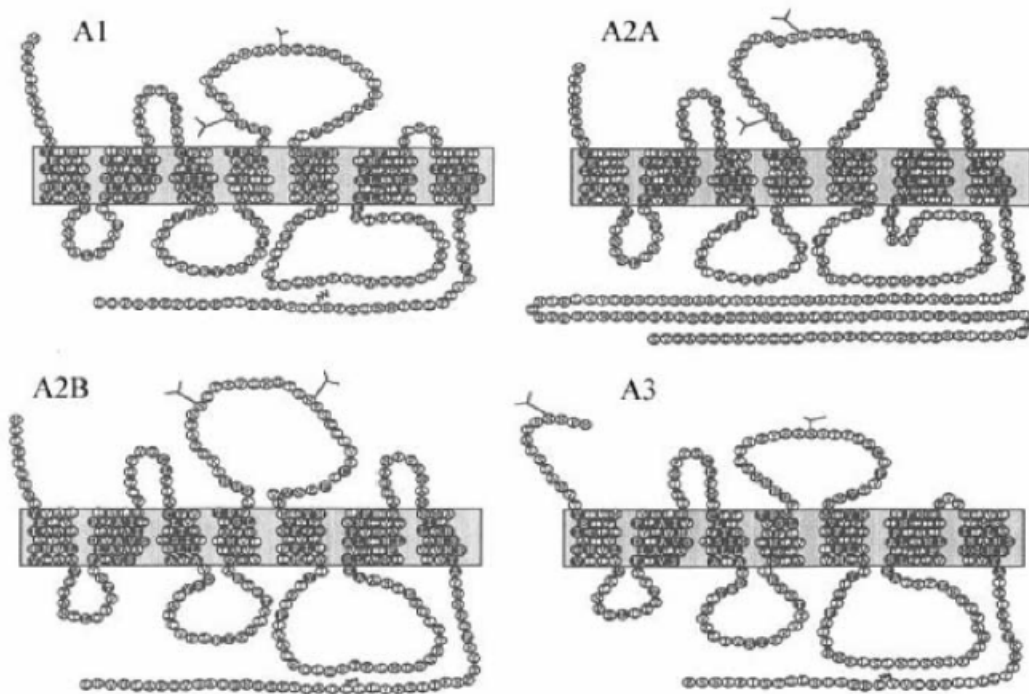
Además de la regulación de la síntesis de adenosina existen vías de degradación, la primera es la fosforilación de la adenosina a AMP por la adenosin quinasa (AK) y la segunda es desaminación a inosina por la adenosina desaminasa (ADA), la principal vía de degradación es mediante fosforilación ya que la AK es cien veces más afín por la adenosina que ADA pero, cuando la concentración de adenosina es muy alta se produce la desaminación (Fisher y Newsholme., 1984).

El hecho que bajo condiciones normales la AK fosforila la adenosina y mantiene una baja concentración intracelular hace que se mantenga el gradiente de concentración que permite la recaptura de adenosina vía ENTs. Sin embargo, ante un incremento intracelular de adenosina se revierte el sentido del transportador con lo cual conduce a la liberación de adenosina hacia el espacio extracelular (Gu et al., 1995).

Tal control de la síntesis y degradación de la adenosina es importante pues pequeños cambios en su concentración pueden sincronizar las actividades neuronales y con esto controlar la transmisión y la plasticidad sinápticas (Ribeiro et al., 2002). Esto se lleva a cabo por la unión a receptores de membrana acoplados a proteína G.

La acción de la adenosina es mediante receptores que pertenecen a la familia de los GPCRs, con una estructura como la que se muestra en la figura 4. Se han clasificado en base a sus propiedades moleculares, bioquímicas y farmacológicas en 4 subtipos:  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  y  $A_3$ . Los receptores  $A_1$  y  $A_{2A}$  son de alta afinidad y se expresan mayoritariamente en el sistema nervioso central (SNC) mientras que los  $A_{2B}$  y  $A_3$  son receptores de baja afinidad por lo que su

activación sólo es relevante en condiciones en las que la adenosina se ve incrementada de forma notoria. Tanto los receptores  $A_1$ , como  $A_{2B}$  y  $A_3$  tienen un peso molecular del orden de 35 kDa, en cambio el  $A_{2A}$  tiene un peso molecular ligeramente superior, de 45 kDa, la diferencia es debida a la larga cola carboxilo terminal que presenta, como se muestra en la figura 4.



**Figura 4.** Estructura de los receptores de adenosina.

De manera global, la secuencia de aminoácidos de todos los receptores de adenosina clonados (Olah, 1995) es consistente con la estructura tridimensional propuesta para los GPCRs (Hibert et al., 1991). Comparten varios rasgos en común con los GPCRs de la familia 1, a la que también pertenecen los receptores de dopamina. Uno de estos rasgos es el puente disulfuro que se forma entre los residuos de cisteína en los bucles extracelulares 1 y 2 (EC1-2),

que le da estabilidad a estos receptores una vez que son insertados en la membrana plasmática (Dohlman et al., 1990). Otro de los rasgos comunes es la presencia de la secuencia consenso DRY (Acido aspartico, Arginina y Tirosina) involucrada en el tráfico de los receptores. Finalmente y excepto para el receptor  $A_{2A}$ , el resto de receptores de adenosina presentan una cisteína en el dominio C-terminal que puede ser palmitoilada, lo que permite la generación de un nuevo bucle intracelular implicado posiblemente en el acoplamiento a la proteína G (Bouvier et al., 1995).

Todos los receptores de adenosina tienen secuencias consenso de N-glicosilación en el EC2 que se cree están implicadas en el tránsito del receptor a la membrana, aunque no existe una evidencia clara de ello (Klotz y Lohse., 1986; Stiles., 1986). Además, todos presentan secuencias consenso de fosforilación en los dominios intracelulares, esta fosforilación está implicada en el mecanismo de desensibilización de los receptores de adenosina (Ramukar et al., 1991; Palmer et al., 1994; Saura et al., 1998). El grado de homología entre los receptores de adenosina es bajo, del orden del 45% (Stehle et al., 1992; Pierce et al., 1992), si bien existen diferencias entre especies como la que tiene lugar entre los receptores  $A_{2A}$  y  $A_{2B}$  que en la rata presentan una homología del 46% y en humano del 61%. Al igual que para otros GPCRs, la mayor homología tiene lugar en las regiones transmembrana, que se cree están próximas entre sí formando el centro de unión del ligando conjuntamente con la zona correspondiente a la mitad N-terminal del segundo bucle extracelular (Fredholm et al., 1994; Rivkees et al., 1999). La interacción con la proteína G tiene lugar básicamente en el tercer bucle intracelular (IC3) y en el extremo C terminal.

La amplia disposición de la adenosina y la distribución de sus receptores en los tejidos juegan un papel importante en muchos procesos fisiológicos, particularmente en tejidos excitables como el corazón y el cerebro (Berne et al., 1983). En el SNC la adenosina es secretada por la mayoría de las células, incluyendo neuronas y células gliales, actuando como neuromodulador de la actividad del SNC, tanto a nivel presináptico como postsináptico y/o extrasináptico.

Por tales motivos los receptores de adenosina tipo  $A_1$  y  $A_{2A}$  se han visto implicados en procesos normales y patofisiológicos, como la inhibición de la liberación de neurotransmisores excitatorios (Phillis et al., 1979; Ciruela, et al., 2006), la inhibición de la actividad motora espontánea, la diferenciación y migración neuronal (Rivkees et al., 1995; Svenningsson et al., 1999; Canals et al., 2005), en los procesos de conocimiento y memoria (Fredholm et al., 2000; Fontinha et al., 2009), la regulación de la función respiratoria y en particular en aquellos procesos relacionados con el sueño (Antle et al., 2001; Bjorness et al., 2009; Longordo et al., 2009), la ansiedad (Johansson et al., 2001) la excitación y participa en la neuroprotección en episodios de hipoxia/isquemia (Moreau y Huber., 1999; Burnstock., 2009).

Se los ha relacionado con la enfermedad de Alzheimer (Maia y De Mendonca., 2002), la enfermedad de Parkinson (Schwarzschild et al., 2002; Jenner et al., 2009), la enfermedad de Huntington (Reggio et al., 1999; Popoli et al., 2008), la esquizofrenia (Ferré et al., 1997; Wardas., 2008), la epilepsia (Dunwiddie y Masino., 2001; Ribeiro et al., 2003) y la adicción a drogas (Maldonado et al., 1996; Manzoni et al., 1998; Knapp et al., 2001; Brown y Short., 2008).



El gen de receptor  $A_1$  está localizado en el cromosoma 1q32.1 (Megson et al., 1995) y se encuentra acoplado a proteínas Gi/o (Freissmuth et al., 1991; Munshi et al., 1991), de manera similar al receptor  $D_2$ , su activación provoca la inhibición de la AC (Londos et al., 1980) así como la activación de la PLC con el consiguiente incremento en los niveles de DAG e IP3 en el interior celular (Gerwins y Fredholm., 1995) y los niveles de calcio intracelular, por lo que a nivel postsináptico el receptor  $A_1$  controla la excitabilidad de la célula debido a la hiperpolarización que produce mediante la activación de canales de potasio (Greene y Haas., 1991, Patel et al., 2001) que parecen ser del tipo GIRK (Gerber et al., 1989; Wetherington y Lambert., 2002).

El receptor a adenosina  $A_1$  presináptico se considera un receptor metabotrópico que controla la transmisión sináptica (Franco et al., 2005; Wong et al., 2006), ya que regula la liberación de múltiples neurotransmisores incluyendo glutamato (Dolphin y Archer., 1983; Barrie y Nichols., 1993; Ladera et al., 2007) y GABA (Hollins y Stone., 1980; Saransaari y Oja., 2005). Esto se debe a que los receptores de adenosina tipo  $A_1$  modulan a los canales de calcio dependientes de voltaje de tipo  $Ca_v2$  (N y P/Q) por un mecanismo delimitado a membrana (Fredholm y Dunwiddie., 1988; Gonçalves et al., 1991; Scholz y Miller., 1991, Wu y Saggau., 1994; Wheeler et al., 1994; Ambrosio et al., 1997; Song et al., 2000; Noguchi y Yamashita., 2000; Wang et al., 2002; Kimura et al., 2003; Moore et al., 2003, Manita et al., 2004; Gundlfinger et al., 2007). Sin embargo, se desconoce si esta modulación se debe a un mecanismo directo o por el contrario se trata de un mecanismo que depende de la modulación previa de los canales de potasio.

Se ha observado que en las terminaciones sinápticas de la corteza cerebral, el receptor de adenosina  $A_1$  reduce la liberación de glutamato inducida por la activación de la vía AC/PKA (Ladera et al., 2007). Además de modular los niveles de AMPc intracelulares, el receptor de adenosina  $A_1$ , interviene en la síntesis de otros segundos mensajeros a través de la activación de la fosfolipasa C y la fosfolipasa A2 (Akbar et al., 1994; Freund et al., 1994; Jockers et al., 1994; Gerwins y Fredholm., 1995).

Por el otro lado el gen para el receptor  $A_{2A}$  humano se encuentra en el cromosoma 22q11.2 y la secuencia proteica presenta un lugar potencial de glicosilación en la que se pueden unir dos tipos de glúcidos diferentes, lo que divide a estos receptores en dos poblaciones (Barrington et al., 1990). Existen estudios en los que se muestra que los receptores  $A_{2A}$  no glicosilados mantienen la capacidad de unir ligando (Piersen et al., 1994), por lo que queda sin determinar la función de la glicosilación en estos receptores. El uso de técnicas de mutación dirigida ha permitido describir de forma detallada los lugares de unión del ligando (Jiang et al., 1996), y mediante la utilización de construcciones quiméricas se han determinado las regiones implicadas en el acoplamiento a la proteína Gs y de esta manera se ha demostrado que la activación selectiva de la proteína G tiene lugar principalmente por el IC3, en su parte más amino terminal (Olah., 1997) y la parte carboxilo terminal parece ser necesaria para la transición al estado activado (Klinger et al., 2002); por lo tanto el activar una proteína Gs lo hace similar al receptor  $D_1$ . Sin embargo, en su estructura el receptor tiene una larga cola que parece estar implicada en la formación de heterómeros con el

receptor  $D_2$  y en la interacción de este receptor con el citoesqueleto de actina (Canals et al., 2003).

Se conoce que la activación por agonista del receptor  $A_{2A}$  induce su desensibilización rápida (Newman y Levitzki., 1983; Anand-Srivastava et al., 1989; Ramkumar et al., 1991; Mundell et al., 1998). En 1997, Palmer y Stiles identificaron el dominio del receptor  $A_{2A}$  responsable de la desensibilización la cual es la porción proximal del segmento C-terminal, aunque esta función es redundante a lo largo de toda la cola del receptor  $A_{2A}$ . Por lo tanto la exposición prolongada al agonista induce internalización, lo que parece ser un paso necesario para la resensibilización o la regulación a la baja de los receptores  $A_{2A}$ . Como en el receptor  $D_1$ , la principal vía de transducción del receptor  $A_{2A}$  depende de la activación de la AC por acoplamiento a la proteína  $G_{s/olf}$ , la cual incrementa los niveles de AMPc, que a su vez activan la PKA que regula el estado de fosforilación de varios sustratos proteicos. Uno de los sustratos de la PKA es DARPP-32, que se expresa en altas concentraciones en neuronas eferentes GABAérgicas (Kull et al., 1999; 2000). La fosforilación por la PKA en la Thr34 convierte a DARPP-32 en un potente inhibidor de la proteína fosfatasa 1 (PP-1) que inhibe la actividad de CREB y de canales de calcio. Este es un de los mecanismos por los que el receptor  $A_{2A}$  activa a CREB, y posiblemente, a canales de calcio, lo que pusimos a prueba en el presente trabajo de tesis. Por otro lado, la PKA también es capaz de estimular a la proteína fosfatasa- 2A (PP-2A), que es la principal fosfatasa responsable de la desfosforilación de DARPP-32 en la posición 75 (Kull et al., 2000). Además de la vía preferencial  $G_{s/olf}/AC$ , los receptores  $A_{2A}$  también usan otras vías de señalización como la mediada por

PLC (Wirkner et al., 2000) y PI3K (fosfatidilinositol 3-kinasa)/Akt (serina-treonina kinasa o PKB) (Lee y Chao., 2001).

Hemos mencionado que los receptores de adenosina tipo  $A_1$  y en especial el receptor  $A_{2A}$  tienen similitudes en la cascada de señalización con los receptores de dopamina tipo  $D_2$  y  $D_1$  respectivamente y que solo en las neuronas espinosas medianas de la vía indirecta se encuentran expresados ambos receptores de adenosina y de dopamina tipo  $D_2$  por lo que es posible que se desarrollen mecanismos compensatorios en casos de patologías como es en el caso de la enfermedad de Parkinson a través de estos receptores. Por tal motivo se ha investigado si existe una interacción entre los receptores de adenosina tipo  $A_1$  y  $A_{2A}$  (Lopes et al., 1999; Cunha et al., 2007; 2008). Se conoce que ambos receptores interactúan entre sí, un ejemplo, se observa que al activar a los receptores  $A_{2A}$ , estos atenúan la capacidad de los receptores  $A_1$  para inhibir el disparo neuronal en el hipocampo (O'Kane y Stone., 1998). Sin embargo estos estudios no son tan claros en explicar qué tipo de interacción existe entre los receptores de adenosina.

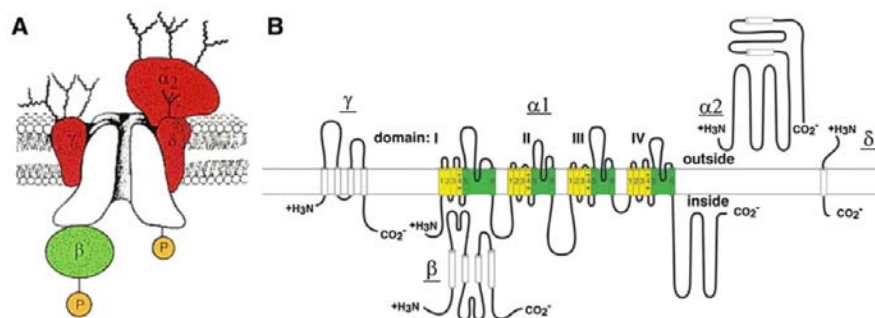
Por otra parte Ciruela y colaboradores en el 2006 demostraron por medio de experimentos de BRET, que los receptores de adenosina tipo  $A_1$  y  $A_{2A}$  pueden formar heterómeros en células HEK y que además la activación de los receptores  $A_{2A}$  reduce la afinidad de la adenosina hacia los receptores  $A_1$ , lo que ha sugerido que bajo condiciones fisiológicas basales, es decir con concentraciones extracelulares bajas de adenosina, se estimula preferentemente a los receptores  $A_1$ , debido a que estos tienen una mayor afinidad por el agonista

endógeno y esto se explica debido a que la ecto-ADA se ancla a proteínas de membrana como el receptor de adenosina  $A_1$  (Franco et al., 1998) ejerciendo su actividad catalítica, además de conferir a este receptor un estado de alta afinidad por la adenosina y permitirle una eficiente transducción de señales (Ciruela et al., 1996; Saura et al., 1996; Torvinen et al., 2002; Ruiz et al., 2000). Sin embargo, cuando la concentración extracelular de adenosina incrementa se activan los receptores de tipo  $A_{2A}$  y se concluye que la acción de los receptores  $A_{2A}$  inhibe la acción de los receptores  $A_1$  y que la existencia del heterómero permite a la adenosina facilitar o inhibir la transmisión glutamatergica dependiente de la concentración y del nivel de excitabilidad de las neuronas (Ciruela et al., 2006). Además existe evidencia de que ambos receptores de adenosina están involucrados en el disparo neuronal y/o la liberación de neurotransmisores (Inoue y Yoshii., 1992, Caterall., 2000, 2008; Ciruela et al., 2006) por lo tanto se puede deducir que los receptores de adenosina tienen como blanco de modulación a los CCDV (Noguchi y Yamashita., 2000, Haas y Selbach., 2000, McCool y Farroni., 2001).

#### 1.4 CANALES DE CALCIO

Estructuralmente los CCDV son complejos heteromultiméricos que se encuentran conformados por subunidades  $\alpha_1$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\alpha_2\delta$ . La subunidad  $\alpha_1$  (190-250 kDa) es la que conforma el poro del canal, posee el filtro de selectividad para el  $Ca^{2+}$ , el sensor de voltaje y la mayor parte de los sitios conocidos para la regulación por segundos mensajeros, drogas y toxinas (Catterall et al., 2005); está constituida

por 4 dominios homólogos cada uno con 6 segmentos transmembranales (S1-S6) (Doering y Zamponi., 2003); el segmento S4 de cada dominio homólogo rota y se desliza bajo la influencia de los campos eléctricos iniciando un cambio conformacional que abre el poro, de modo que funciona como sensor de voltaje; el lazo que une los segmentos S5 y S6 se encuentra asociado a la membrana, conforma la entrada externa del poro y contiene residuos de glutamato en cada dominio que determinan la selectividad al  $\text{Ca}^{2+}$  (Catterall., 2000). Las otras subunidades regulan las propiedades biofísicas y el tráfico de la subunidad  $\alpha 1$  (Arikkath y Campbell., 2003). La subunidad  $\beta$  (55 kDa) se encuentra completamente inmersa en el citoplasma, pues no tiene segmentos transmembranales, la subunidad  $\gamma$  (33 kDa) contiene 4 segmentos transmembranales, la subunidad conformada por el dímero  $\alpha 2\delta$  (170 kDa) está constituida por la sección  $\delta$  que está unida a la membrana a través de un segmento transmembranal, mientras que la sección  $\alpha 2$  está localizada del lado extracelular; ambas se encuentran unidas por un puente disulfuro generado por modificaciones post-traducción (Catterall., 2000) (Figura 5).



**Figura 5.** Estructura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  activados por voltaje. (Tomado de Catterall y Few., 2008).

Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  han sido clasificados en los tipos  $\text{Ca}_v1$  (L),  $\text{Ca}_v2$  (N, P/Q, R) y  $\text{Ca}_v3$  (T) por sus propiedades biofísicas y farmacológicas. A los que son activados por voltajes de alrededor de -50 mV (L, N, P/Q) también se les conoce como HVA (activados a voltajes “elevados”). A los activados por voltajes de alrededor de -70 mV (T) se les conoce como LVA (activados a “bajos” voltajes). Por último, a los canales de tipo R se les conoce como activados por voltajes intermedios. Los distintos canales de  $\text{Ca}^{2+}$  expresan diferentes subunidades  $\alpha 1$ . Actualmente, se utiliza una nomenclatura similar a la de otros canales activados por voltaje (Doering y Zamponi., 2003; Tabla 1).

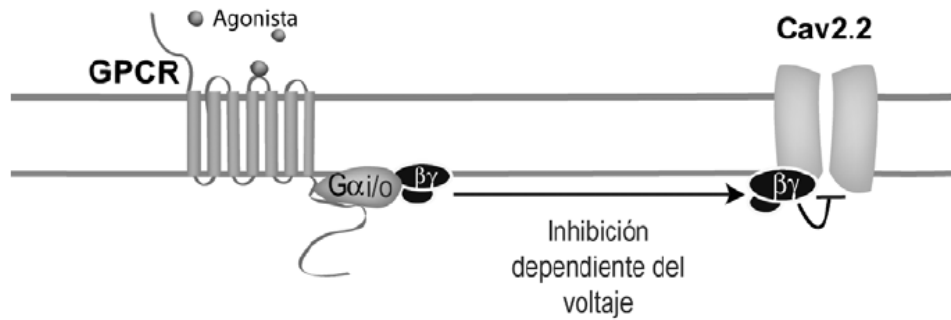
Existen bloqueadores específicos para las distintas familias de canales L, N y P/Q (ver tabla 1). Las dihidropiridinas (DHPs) son fármacos que bloquean o activan los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L actuando alostéricamente para cambiar el canal del estado abierto al cerrado. La  $\omega$ -conotoxina GVIA es una toxina obtenida de un caracol marino (*Conus geographus*) que bloquea específicamente el canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo N, mientras que las toxinas  $\omega$ -agatoxina TK y  $\omega$ -agatoxina IVA obtenidas del veneno de una araña (*Agelenopsis aperta*) bloquean específicamente los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo P/Q (que tiene muchas variantes por *splice* alternativo). Los canales de tipo R son bloqueados por la toxina SNX 482 derivada del veneno de tarántula (*Hysteroocrates gigas*), pero esta toxina no es muy específica (Catterall., 2000). Finalmente, los canales de tipo T son bloqueados por la toxina kurtoxina obtenida de un escorpión (*Parabuthus transvaalicus*) aunque esta toxina tampoco es muy específica (Doering y Zamponi., 2003).

| Superfamilia | Familia     | Subunidad<br>$\alpha 1$ | Nombre<br>propuesto | Farmacología                                      |
|--------------|-------------|-------------------------|---------------------|---|
| HVA          | L           | $\alpha 1S$             | $Ca_v1.1$           | Dihidropiridinas<br>(DHP)                         |
|              |             | $\alpha 1C$             | $Ca_v1.2$           |   |
|              |             | $\alpha 1D$             | $Ca_v1.3$           |   |
|              |             | $\alpha 1F$             | $Ca_v1.4$           |   |
|              | P/Q         | $\alpha 1A$             | $Ca_v2.1$           | $\omega$ -agatoxina TK<br>$\omega$ -agatoxina IVA |
|              | N           | $\alpha 1B$             | $Ca_v2.2$           | $\omega$ -conotoxina GVIA                         |
| R            | $\alpha 1E$ | $Ca_v2.3$               | SNX 482*            |   |
| LVA          | T           | $\alpha 1G$             | $Ca_v3.1$           | Kurtoxina*  |
|              |             | $\alpha 1H$             | $Ca_v3.2$           |   |
|              |             | $\alpha 1I$             | $Ca_v3.3$           |   |

**Tabla 1. Estructura general, nomenclatura y farmacología de los canales de  $Ca^{2+}$ .** \* No existen bloqueadores específicos reportados en la actualidad (Modificada de Doering y Zamponi, 2003).

Los canales de calcio pueden ser modulados directamente por proteínas G a través de la subunidad  $\beta\gamma$ ; este mecanismo, puede tanto inhibir como activar algunos tipos de canales iónicos (Clapham y Neer., 1997). Tanto los receptores como las proteínas G y los canales iónicos se encuentran unidos a la membrana plasmática. Una interacción directa entre el canal y la proteína G es el modo más rápido para la regulación de canales y es denominada “modulación delimitada a membrana”, pues no intervienen agentes difusibles en el citosol, sino únicamente los presentes en la membrana (Hille., 2001; Figura 6).





**Figura 6. Modulación directa de un canal iónico a través de la subunidad  $\beta\gamma$  de la proteína G.** Señalización delimitada a membrana mediada por el receptor sobre un canal de  $\text{Ca}^{2+}$ . En esta señalización, se requieren al menos 3 moléculas, el receptor, la proteína G y el canal.

La modulación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de alto umbral de activación vía delimitada a membrana se describió hace 30 años al estudiar la activación de receptores adrenérgicos, serotoninérgicos o de tipo  $\text{GABA}_B$  y se encontró que ocurría básicamente sobre los canales de tipo N (aunque también se ha descrito para los P/Q). Podía ser inducida por receptores muscarínicos, somatostatinérgicos, dopaminérgicos y de adenosina (Yan y Surmeier., 1996; Tedford y Zamponi., 2006).

Las propiedades esenciales de esta inhibición son: I) su sensibilidad a PTX, lo cual involucra proteínas  $G_i$  y/o  $G_o$ , II) que la reducción de la corriente al pico se presenta de un modo dependiente de voltaje, con una inhibición más evidente a potenciales más hiperpolarizados (Tedford y Zamponi., 2006; Brown y Sihra., 2008).

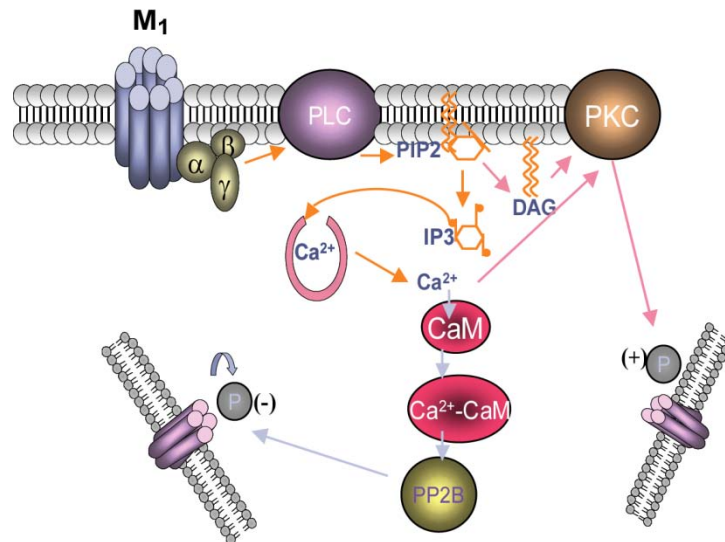
Así, los receptores a adenosina pueden mediar la inhibición de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo N y P/Q a través de la actividad de la subunidad  $G\beta\gamma$ , liberada por las proteínas  $G_i$  (Song et al., 2000; McCool y Farroni., 2001; Gundlfinger et al., 2007). Se ha descrito que los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo N y P/Q pueden ser

inhibidos a través de la activación de los receptores a adenosina de tipo  $A_1$  sensibles a PTX por este mecanismo de modulación (Gundlfinger et al., 2007). Finalmente, la inhibición delimitada a membrana de las  $ICa^{2+}$  y su reversión, tienen efectos importantes sobre la liberación de neurotransmisores en la terminal presináptica (Brown y Sihra., 2008). Así, debido a su dependencia de voltaje, las ráfagas de potenciales de acción de alta frecuencia pueden revertir la inhibición presináptica (Brody et al., 1997). Sin embargo, se ha descrito que los canales de  $Ca^{2+}$  también pueden sufrir modulación que involucra segundos mensajeros citosólicos, que por ende, es una modulación más lenta, debido a que la probabilidad de apertura de los canales de calcio depende de su nivel de fosforilación por la acción de proteínas cinasas y fosfatasas. Existen varias evidencias bioquímicas que han ligado las acciones de los receptores de adenosina con cadenas de señalización que terminan en la activación de PKA o PKC, a su vez, las acciones de la PKC sobre las corrientes de  $Ca^{2+}$  son muy diversas, ya que se han reportado tanto efectos inhibidores (Boland et al., 1991) como potenciadores (Hall et al., 1995).

En resumen, la modulación diferencial de los canales de  $Ca^{2+}$  por segundos mensajeros intracelulares constituye un mecanismo de señalización clave para controlar la entrada de  $Ca^{2+}$ , la excitabilidad y demás funciones asociadas (Bargas et al., 1994; Zamponi y Snutch., 1998; Hernández-López et al., 1997, 2000, Perez-Burgos et al., 2009; Hernandez-Flores T et al., 2014; Figura 7).

Los efectos de los receptores de adenosina sobre los canales de  $Ca^{2+}$  activados por voltaje han sido descritos en células del ganglio de la raíz dorsal y en cultivos de neuronas del hipocampo (Dolphin et al., 1986; Scholz y Miller., 1991). En

estas preparaciones, la actividad de los receptores de adenosina suprime las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$ .



**Figura 7. Ejemplo de la modulación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  por segundos mensajeros a través de la activación del receptor muscarínico  $\text{M}_1$ .** El blanco de la proteína G es una enzima membranal (PLC) que produce segundos mensajeros que a su vez activan proteínas capaces de fosforilar (PKC) o desfosforilar (PP2B) el canal.

Los cambios en los niveles plasmáticos de neurotransmisor pueden provocar cambios en las corrientes llevadas por los canales de calcio (modulación) y en consecuencia, cambiar tanto los patrones de liberación de transmisor en las terminales, como el patrón temporal de disparo generado a nivel somatodendrítico (Pérez-Garci et al., 2003; Pérez-Roselló et al., 2005).

## 1.5 ENFERMEDAD DE PARKINSON

La enfermedad de Parkinson (EP) fue descrita en 1817 por el médico británico James Parkinson, el cual observó pacientes con temblores involuntarios, rigidez e incapacidad para ejecutar movimientos (Lees et al., 2009). En la década de 1950 Arvid Carlsson demostró que la dopamina actúa como un transmisor en el

cerebro (Girault y Greengard., 2004). A finales de esta década Oleh Hornykiewicz demostró que en la EP se veían disminuidos los niveles de dopamina en el estriado. Esto llevo a los investigadores a administrar L-DOPA a los pacientes, precursor químico de la dopamina, para restituir los niveles de dopamina en el cerebro y contrarrestar así las manifestaciones clínicas de los pacientes (Hornykiewicz., 2004). El éxito inicial fue espectacular: los pacientes ya podrían moverse y recuperar mucho de su función motora. Sin embargo el mismo tratamiento con L-DOPA induce otra enfermedad discapacitante: las discinesias, o movimientos descontrolados y descoordinados (Mercury y Bernardi., 2005).

La EP es considerada una enfermedad neurodegenerativa y progresiva asociada con el envejecimiento aunque existen síndromes Parkinsonicos que aparecen en edades tempranas y enfermedad de Parkinson juvenil heredada (Giasson y Lee., 2001). No se cura. Los tratamientos simplemente tratan de paliar los signos de la enfermedad, sumamente discapacitantes, y mejorar la calidad de vida de los pacientes (, Mercury y Bernardi., 2005; Kringelbach et al., 2007; Mendez et al., 2008; Li et al., 2008; Lees A et al., 2009). El estudio de las acciones purinérgicas descritas en esta tesis va en ese sentido.

Las características anatomopatológicas mas distintivas de la EP incluyen la muerte progresiva de neuronas en diferentes áreas del tallo cerebral comenzando con el núcleo del vago, los núcleos pedúnculo pontinos hasta llegar a las neuronas de SNc que son las que secretan dopamina. La degeneración neuronal sucede acompañada por la acumulación de agregados de alfa-sinucleina (cuerpos de Lewy) en la medula espinal, tallo y corteza cerebral (Del

Tredici y Braak., 2012). No se sabe la causa en la mayoría de los casos: enfermedad de Parkinson Idiopática. Las hipótesis incluyen factores genéticos y medio ambientales.

El tratamiento con L-DOPA para restituir la síntesis de dopamina en las terminales que todavía no se han muerto, así como el tratamiento con agonistas dopaminérgicos es efectivo sólo por un tiempo (de 5 a 7 años hace unas décadas, de 15 a 20 años en la actualidad). Como se apuntó arriba, la L-DOPA y los agonistas traen consigo efectos secundarios tales como discinecias, desordenes de la impulsividad (e.g., hipersexualidad, ludopatía) y otros signos motores y psiquiátricos. La depresión es un problema grave (Mercuri y Bernardi., 2005; Lees et al., 2009).

Con el afán de mejorar el tratamiento médico se tiene la hipótesis de bajar las dosis de L-DOPA que provocan estas acciones colaterales con la ayuda de otros fármacos que actúen sobre las mismas células blanco de la dopamina. Así, la L-DOPA se combina con inhibidores de la monoamino oxidasa B, con antagonistas colinérgicos y con antagonistas del receptor a adenosina del tipo  $A_{2A}$ . Entre otros. Respecto de estos antagonistas, la razón es que la depleción de dopamina propia de la enfermedad se acompaña de aumentos en las concentraciones de acetilcolina y adenosina en el estriado (Ding et al., 2006; Jenner., 2014).

El uso de antagonistas para los receptores de adenosina se ha propuesto debido a que durante la EP hay un aumento en la excitabilidad neuronal de las neuronas de la vía indirecta (Rouse et al., 2000; Morelli et al., 2009; Aosaki et al., 2010; Kulisevsky y Poyurovsky., 2012) lo que hace que se incremente la concentración de adenosina, lo que aumenta aun más la excitabilidad neuronal al activarse los

receptores de adenosina de tipo  $A_{2A}$ , creando un círculo vicioso que empeora cada vez más la actividad en la vía indirecta. Se considera que al usar los antagonistas de los receptores  $A_{2A}$ , expresados en las neuronas de la vía indirecta (Ferré et al., 1997; Fredholm et al., 2001) se rompa el círculo vicioso y la excitabilidad. Así, se propone, los antagonistas del receptor  $A_{2A}$  serían coadyuvantes de la L-DOPA y con esto se bajarían las dosis de la misma con el consecuente retardo en la aparición de las discinesias.

Sin embargo, hasta el presente trabajo no se habían reportado acciones electrofisiológicas directas de los fármacos purinérgicos sobre sus receptores. Para conocer las acciones de la adenosina y fármacos afines sobre los receptores a adenosina, decidimos utilizar a los canales de calcio como efectores finales de la cadena de señalización de estos receptores.

La participación de los receptores de los tipos  $A_1$  y el  $A_{2A}$  en la enfermedad de Parkinson estaría dada por la distribución de estos receptores en el cerebro y principalmente en el estriado. Los receptores  $A_1$  se expresan en neuronas GABAérgicas de proyección, tanto en las neuronas de la vía directa como en las indirecta, mientras que el receptor  $A_{2A}$  se expresan casi exclusivamente en neuronas GABAérgicas de la vía indirecta (Ferré et al., 1997; Fredholm et al., 2001).

Los receptores  $A_{2A}$  se localizan de forma postsináptica en las neuronas de la vía indirecta (Hettinger et al., 2001) y colocalizan con los receptores  $D_2$  de dopamina (Schiffmann et al., 1991; Fink et al., 1992; Hillion et al., 2002). Se ha observado que en pacientes con EP se incrementa la expresión de estos receptores. (Varani et al., 2010).

Por lo anterior, en la presente Tesis describimos el mecanismo de acción por el cual los receptores de adenosina tipo  $A_1$  y  $A_{2A}$  modulan de manera selectiva y dependiente de la concentración, los canales de calcio de las NEMs de rata.

## 2. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Parkinson es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente. Es un elemento del conjunto de enfermedades que están llevando los Sistemas Nacionales de Seguridad Social y de Pensiones al punto económico crítico. Su prevalencia en la población mayor a 65 años es de 2%, porcentaje que incrementa significativamente con la edad. El tratamiento de elección es la administración de L-DOPA sin embargo la eficacia de este tratamiento es limitada pues conlleva efectos secundarios severos. En los últimos años se ha favorecido el uso de los antagonistas a receptores de adenosina tipo  $A_{2A}$  como coadyuvantes en el tratamiento médico de la enfermedad ya que se piensa que estos pueden usar la misma vía de señalización descrita para los receptores de dopamina tipo  $D_1$  y en condiciones basales incrementar el disparo neuronal. Por otra parte se ha observado que los receptores  $A_{2A}$  se encuentran sobreexpresados en neuronas de la vía indirecta durante la enfermedad y en estas neuronas existe un incremento del disparo y con ello hay una sobreinhibición de la vía indirecta y por ende provocar los síntomas de acinesia y rigidez característicos de la enfermedad de Parkinson; anteriormente se había descrito que beber café (antagonista inespecífico de los receptores de adenosina) disminuye la probabilidad de padecer enfermedad de Parkinson y o

alargar el tratamiento de la L-DOPA (Ferre et al., 2008; Ribeiro y Sebastião., 2010).

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Evidencias indirectas de tipo conductual, bioquímico y fisiológico han dado lugar al modelo fisiopatológico actualmente usado para entender la EP. (Calabresi et al 2014) Este modelo postula que al disminuir los niveles de DA ocurre un incremento en el disparo de las neuronas estriatales de proyección (espinosas medianas) de la vía indirecta, lo que lleva a la acinesia y la rigidez. Este incremento en el disparo conduce además a un incremento en la liberación de moduladores como en el caso de la adenosina. Nos preguntamos si su acción sobre los canales de calcio que regulan la excitabilidad está involucrada con el aumento en la actividad de las neuronas espinosas medianas de la vía indirecta. Por lo tanto, en este trabajo se estudió el papel de los receptores tipo  $A_1$  y  $A_{2A}$  en la modulación de los canales de calcio de las NEMs y la correlación de dicha modulación con la excitabilidad neuronal.

Las preguntas que guiaron la investigación fueron las siguientes:

- a) ¿Qué magnitud tiene la modulación de la corriente de  $Ca^{2+}$  mediada por los receptores  $A_1$  y  $A_{2A}$ ?
- b) ¿Existe algún tipo de interacción entre estos receptores?
- c) ¿Qué tipo de canales de  $Ca^{2+}$  son modulados por los receptores  $A_1$  y  $A_{2A}$ ?
- d) ¿Qué relación tiene la modulación de los canales de  $Ca^{2+}$  con la excitabilidad de las NEMs?



#### 4. OBJETIVO GENERAL

- Determinar cuales son las acciones de los receptores purinérgicos  $A_1$  y  $A_{2A}$  sobre la corriente de calcio dependiente de voltaje en neuronas estriatales de proyección (NEMs) en el cerebro de la rata.

##### 4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar mediante fijación de voltaje en célula entera el efecto de los receptores  $A_{2A}$  sobre la corriente de calcio en las NEMs.
- Determinar el efecto de la interacción entre los receptores  $A_{2A}$  y  $A_1$ , sobre la corriente de calcio.
- Averiguar que clases de corriente de calcio son moduladas por cada receptor.
- Observar si las acciones de estos receptores mediante fijación de corriente, impactan la excitabilidad celular.

#### 5. HIPÓTESIS

- La activación de los receptores  $A_1$  disminuye la corriente de calcio en las NEM's.
- La activación de los receptores  $A_{2A}$  aumenta la corriente de calcio en las NEM's.
- Cuando ambos receptores estén presentes en la misma neurona, las acciones de los receptores  $A_1$  predominarán sobre la acción de los receptores  $A_{2A}$ .
- Para observar la acción de los receptores  $A_{2A}$  estos han de ser habilitados por la acción previa de los receptores  $A_1$ .

## 6. ESTRATEGIAS, MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 OBTENCIÓN DE NEURONAS Y FIJACION DE VOLTAJE.

Los protocolos utilizados se realizaron conforme a las guías para el cuidado y uso de los animales de laboratorio de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) que incluye minimizar el número de animales utilizados hasta alcanzar significancia estadística y evitar el sufrimiento animal.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (100-120 g) del bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Estas, fueron anestesiadas profundamente y su cerebro extraído rápidamente mediante disección. El cerebro se introdujo en una solución salina a 4°C y cuya composición es (en mM): 126 NaCl, 3 KCl, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 11 glucosa, 0.2 tiourea, 0.2 ácido ascórbico (pH 7.4 ajustado con HCl, 300±5 mOsm/l, saturada con 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>). Después, con ayuda de un vibratomo (Ted Pella, Reading, CA), se obtuvieron rebanadas sagitales de 300 µm de espesor que fueron mantenidas en buenas condiciones entre 1 a 6 hrs antes de ser utilizadas para el registro, en la misma solución salina a temperatura ambiente (~25°C; Bargas et al., 1994; Vilchis et al., 2000).

De cada rebanada se disecó y utilizó el estriado dorsal. Este fue incubado en solución salina (con 10 mM de HEPES) y enzimas proteolíticas (1 mg/mL de Pronasa E tipo XIV durante 15-20 minutos a 37°C). Después de un periodo de digestión, el tejido fue transferido a una solución baja en Ca<sup>2+</sup> (0.4 mM) para disociar a las neuronas mecánicamente con pipetas Pasteur pulidas con calor a diámetros de punta descendentes. El sobrenadante obtenido fue colocado (1 mL) en cajas de cultivo montadas en la platina de un microscopio invertido. Las células se adhieren espontáneamente al piso del plato de cultivo (10-15

minutos). Luego son perfundidas con 1 mL de la solución de registro que contiene (en mM): 0.001 tetrodotoxina (TTX), 140 NaCl, 3 KCl, 5 BaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES y 10 glucosa (pH 7.4 ajustado con NaOH, 300±5 mOsm/L). Esta misma solución fue usada para perfundir a las células durante el registro con un sistema de microperfusión regulado por miniválvulas automáticas (Vilchis et al., 2000).

Las corrientes de Ca<sup>2+</sup> fueron obtenidas por medio de registros de fijación de voltaje en célula entera en neuronas estriatales de tamaño medio (10-12 μm de diámetro y 5-10 pF de capacitancia total; Yan y Surmeier, 1996) escogiendo las que tenían unos cuantos troncos dendríticos cortos para obtener la fijación espacial del voltaje. Para el registro se emplearon pipetas de vidrio de borosilicato (WPI; Sarasota, FL) estiradas y pulidas con ayuda de un estirador de pipetas (Sutter Instruments, Novato, CA) y una microforja, respectivamente (Nikon, Melville, NY). La composición de la solución interna fue (en mM): 180 *N*-methyl-D-glucamina (NMDG), 40 HEPES, 10 EGTA, 4 MgCl<sub>2</sub>, 2 ATP, 0.4 GTP y 0.1 leupeptina (pH 7.2 ajustado con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 280±5 mOsm/L). Los registros de célula entera fueron realizados con técnicas estándar: la resistencia de los electrodos fue de 3-6 MΩ en el baño y el potencial de unión fue corregido (5-15 mV aproximadamente). Los registros fueron obtenidos con ayuda de un electroméetro (Axopatch 200B; Axon Instruments, Foster City, CA) monitoreados con el programa pClamp versión 8.2 (Axon Instruments). Después de que la pipeta sellaba en la membrana se compensaba la capacidad espuria. Después de romper el sello y acceder el interior celular se compensaba la resistencia en

serie ( $\leq 10\text{-}20\text{ M}\Omega$ ) en un 70 - 80%. Esta resistencia era monitoreada durante el experimento mediante un pulso rectangular de voltaje. Todos los registros eran almacenados en una computadora a través de una tarjeta de adquisición de datos para su posterior análisis (Perez-Rosello et al., 2005; Salgado et al., 2005). La relación corriente-voltaje (curva I-V) obtenida de los registros de corriente pasando por los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (utilizando  $\text{Ba}^{2+}$  como acarreador de carga) se tomó antes y después de la aplicación de los distintos fármacos. Estas curvas fueron construidas con comandos de voltaje en forma de pasos (cada 10 mV) rectangulares de 20 ms de duración desde -80 hasta 50 mV. También utilizamos comandos de voltaje en forma de rampa (200 ms de duración y 0.7 mV/ms desde -80 a 50 mV). Cuando las curvas I-V obtenidas con ambos métodos coincidían considerábamos que se lograba obtener un buen control temporal y espacial del voltaje (Perez-Rosello et al., 2005; Salgado et al., 2005). Por razones de claridad, la mayor parte de las figuras muestran los trazos representativos obtenidos con los comandos en forma de rampa (Figura 8).

Los fármacos fueron aplicados mediante un sistema de microperfusión a base de gravedad posicionando las pipetas de suministro a 100  $\mu\text{m}$  de la célula registrada en dirección del flujo de perfusión. Para los cambios de solución se utilizó un mecanismo de microválvulas (Lee; Essex, CT, USA) controladas por corriente directa.

Los reactivos usados fueron;  $\omega$ -conotoxina GVIA ( $\omega$ -CgTx-GIVA),  $\omega$ -agatoxina TK ( $\omega$ -AgTx), tetrodotoxina (TTX) (adquiridas de Alomone, Jerusalén, Israel), nicardipina, adenosina (de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), el agonista de los

receptores  $A_1$ : 2-cloro N6-cyclopentiladenosina (CCPA), el agonista de los receptores  $A_{2A}$ : 4- [2- [[ 6-Amino -9- (N-ethyl-b-D-ribofuranuronamidosyl) -9H-purin2yl] amino] ethyl] benzene propanoic acid hydrochloride (CGS 21680), el antagonista a los receptores  $A_{2A}$ : 2-(2-Furanyl)-7-(2-phenylethyl) -7H-pyrazolo [4,3-e] [1,2,4] triazolo [1,5-c] pyrimidin-5-amine (SCH 58261) y el antagonista de los receptores  $A_1$ : 8-cyclophentyl-1,3-dimethylxanthine (CPT) (de Tocris Cookson, Ellisville, MO).

Estas sustancias fueron disueltas en agua para alcanzar la concentración deseada. El CGS21680 fue preparado con dimetil sulfóxido (DMSO, con una concentración final máxima del 1%) y la nicardipina fue preparada en ácido clorhídrico con una concentración final máxima de 1%; en cuyo caso las soluciones control también contenían DMSO o HCl a la misma concentración, respectivamente.

Los datos digitalizados fueron analizados y graficados con un programa de cómputo comercial (Origin 7; Microcal, Northampton, MA). De este análisis se obtuvieron las relaciones corriente-voltaje (curvas I-V), antes y después de la aplicación de los fármacos. Obteníamos la media  $\pm$  el error estándar de la media (E.E.M.) de la amplitud máxima de la corriente de  $Ba^{2+}$  y los cambios obtenidos fueron reportados en porcentajes. Se reportan también las medianas (percentil 50) y los percentiles 5, 25, 75 y 95 construyendo graficas de Tukey. La significancia estadística se obtuvo con las siguientes pruebas estadísticas no paramétricas: T de Wilcoxon para experimentos apareados, U de Mann-Whitney para comparaciones no apareadas, y ANOVAs de Kruskal Wallis y pruebas post hoc de Dunns para el caso de comparaciones.

## 6.2 FIJACION DE CORRIENTE.

Por otra parte se realizaron registros electrofisiológicos en rebanadas de cerebro con la técnica de célula entera en fijación de corriente para observar los efectos de la adenosina en el disparo neuronal. Para tal motivo las rebanadas fueron visualizadas con un sistema de videomicroscopía infrarroja.

En estos experimentos se utilizaron micropipetas de borosilicato (World Precision Instruments, Inc. FI. USA) con resistencias de 3 – 6 M $\Omega$ , los cuales contenían un solución interna compuesta por (en mM): 115 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 10 HEPES, 1.1 EGTA, 0.2 Na<sub>2</sub>ATP, 0.2 Na<sub>2</sub>GTP, biocitina al 5%, pH = 7.2 y osmolaridad de 275 mOsm/l. La estimulación sináptica se utilizó un electrodo bipolar concéntrico (50 micras de diámetro) colocado en la superficie de la rebanada a nivel de la corteza cerebral (capa 5) para estimular la vía cortico-estriatal. La adquisición de datos en ambos tipos de registro se realizó con un programa diseñado en el laboratorio en el ambiente Lab VIEW (National instruments, AustinTX)

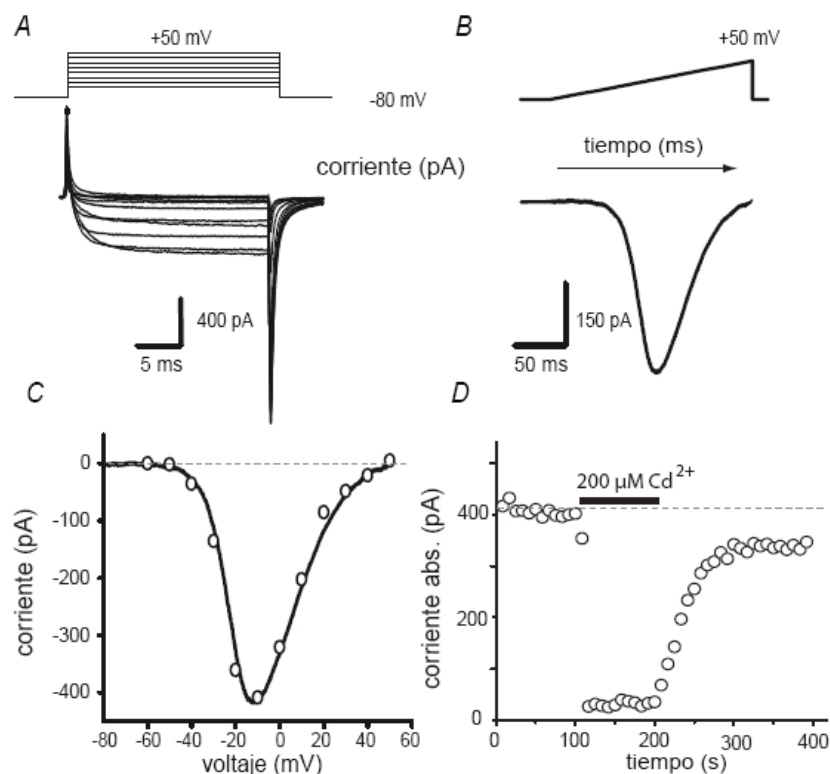
Las neuronas de proyección fueron identificadas por sus propiedades electrofisiológicas (Bargas et al., 1989; Galarraga et al., 1989). Además se llenaron con biocitina para ser posteriormente identificadas con técnicas histoquímicas (Galarraga et al., 1999).

## 7. RESULTADOS

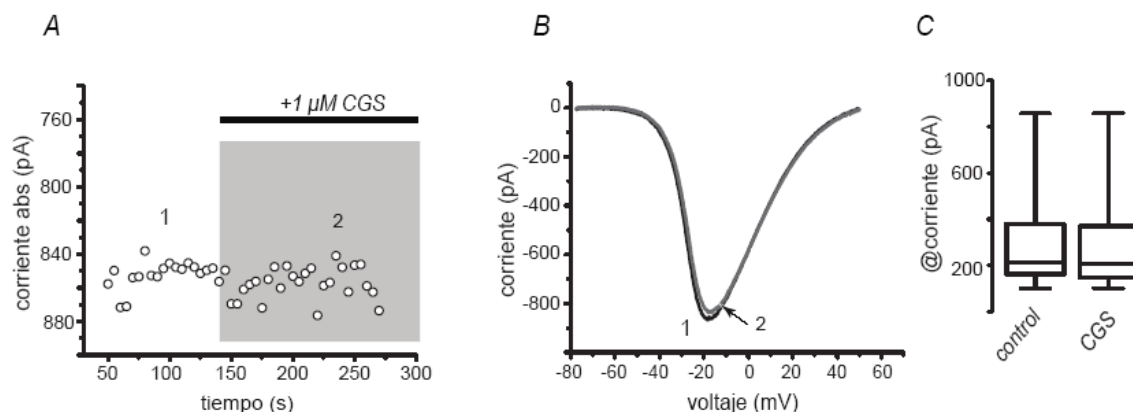
Se obtuvieron familias de corrientes de  $Ba^{2+}$  mediante la estimulación de las NEMs con pulsos de voltaje de -80 a +50 mV en pasos de 10 mV cada uno con una duración de 20 ms (Figura 8 A). También utilizamos comandos en forma de rampa llevando el potencial de la célula de -80 a +50 mV en una duración de 180 ms (Figura. 8 B). Con estos protocolos se obtuvieron las relaciones corriente-voltaje (curvas I-V; Figura. 8 C). Las curvas obtenidas con ambos protocolos se sobrepone. Lo que sugiere control espacial del voltaje. Por claridad ilustraremos curvas I-V obtenidas con el comando en forma de rampa. Por comodidad hablaremos de corrientes de  $Ca^{2+}$ , pues estos son los canales cuya modulación nos interesa, a pesar de usar al  $Ba^{2+}$  como acarreador de carga. La adición de  $Cd^{2+}$  (200  $\mu$ M) abolió por completo estas corrientes (Figura 8 D).

Para observar la acción de los receptores de tipo  $A_{2A}$  se utilizó el agonista CGS 21680 a diferentes concentraciones (5 nM – 10  $\mu$ M; Figura. 9). Sorpresivamente, bajo estas condiciones no hubo modulación de las  $ICa^{2+}$  (n = 6). En algunos casos la corriente incluso llegó a disminuir.

En los siguientes experimentos se utilizó adenosina a bajas (100 nM) y altas (10 $\mu$ M) concentraciones (Figuras. 10 A y B) para activar a los receptores  $A_1$  y  $A_{2A}$  en secuencia, ya que el primero tiene más afinidad que el segundo, y así evaluar sus acciones sobre las corrientes de calcio. Bajas concentraciones de adenosina disminuyeron la corriente de manera significativa:  $29 \pm 3$  % de la  $ICa^{2+}$ , sugiriendo una acción del receptor  $A_1$ .



**Figura 8. Protocolos usados para obtener las corrientes de calcio en las neuronas neostriatales.** A) Corrientes de  $\text{Ba}^{2+}$  generadas por comandos despolarizantes de -80 a 50 mV en pasos de 10 mV con duración de 20 ms. B) Corrientes de  $\text{Ba}^{2+}$  generadas por comandos de voltaje en forma de rampa de 180 ms de duración (0.7mV/ms). C) Relaciones I-V construidas con las mediciones de ambos protocolos. Los círculos corresponden a los comandos rectangulares y la línea continua al comando en forma de rampa. Note la sobreposición. D) Curso temporal de la corriente de calcio antes y durante la adición de  $200 \mu\text{M}$  de  $\text{Cd}^{2+}$ . El bloqueo es reversible e indica que se trata de una corriente que pasa por canales de  $\text{Ca}^{2+}$ .



**Figura 9. El agonista selectivo para los receptores  $\text{A}_{2\text{A}}$  no modula la corriente de calcio por sí solo.** A) Curso temporal en presencia de  $1 \mu\text{M}$  CGS (barra horizontal): no hay cambios en la amplitud de la corriente. B) Relaciones I-V antes y después de la aplicación de CGS. C) El resumen ( $n = 6$ ) muestra que no hay efectos significativos.



Posterior a esta acción, el incremento en la concentración de adenosina revirtió parcialmente este efecto y aumentó la corriente en  $21 \pm 3 \%$ , sugiriendo que ahora la acción se debió al receptor de baja afinidad, el  $A_{2A}$ . En apoyo de esta inferencia, este último efecto solo se observó en la mitad de las neuronas registradas, lo cual concuerda con que los receptores de adenosina de tipo  $A_{2A}$  se encuentran solo en neuronas de la vía indirecta (la mitad de las NEMs).

La figura 10C resume los resultados de esta serie de experimentos mostrando medianas y percentiles: control: mediana = 408 pA y rango (percentiles 25 a 75) = 307 - 557 pA. En presencia de 100 nM de adenosina la corriente de calcio disminuye a 298 (237 - 400) pA. Al aplicar 10  $\mu$ M de adenosina la corriente incrementa a: 331 (301 - 478) pA. Estos cambios fueron significativos ( $P < 0.0001$ ; ANOVA Kruskal-Wallis).

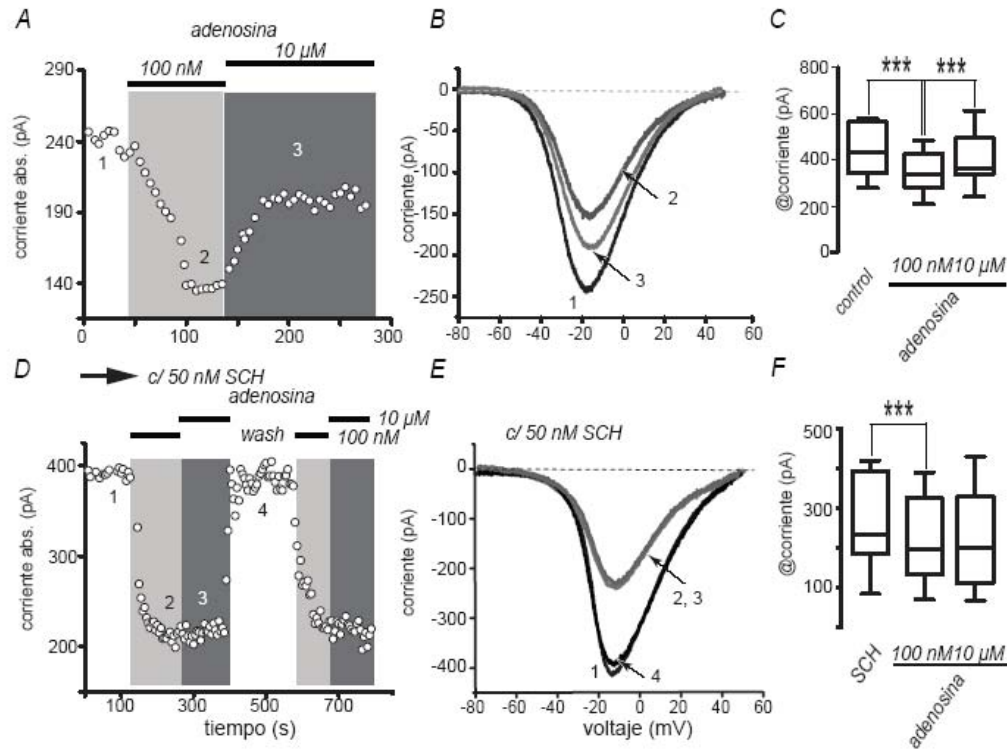
Para corroborar que esta acción secuencial es causada por la acción secuencial de los receptores purinérgicos se utilizó un antagonista selectivo de los receptores de tipo  $A_{2A}$  (50 nM de SCH 58261). Las Figuras 10 D y E muestran que en presencia del antagonista la aplicación de bajas concentraciones de adenosina (100 nM) siguió disminuyendo la corriente de manera significativa ( $21\% \pm 4\%$   $n = 13$ ;  $P < 0.0001$  ANOVA de Kruskal-Wallis), por lo que corroboramos que la acción de disminución de la corriente de calcio es mediada por los receptores  $A_1$ . Sin embargo, la concentración de 10  $\mu$ M de adenosina ya no tuvo efecto, lo que permite corroborar que la reversión o incremento se debe a la activación del receptor  $A_{2A}$ .

La figura 10F resume los resultados de esta serie de experimentos (mediana y rango 25-75): control: 227 (176 - 391) pA; 100 nM de adenosina: 191 (124 - 322) pA ( $P < 0.0001$ ); 10  $\mu$ M de adenosina: sin efecto significativo, debido a la presencia del antagonista.

Se concluye que hay un efecto bifásico dependiente de la concentración en la mitad de las neuronas registradas. Debido a las afinidades de los receptores y al antagonista utilizado podemos inferir que el incremento en la corriente se debe a los receptores de adenosina de tipo  $A_{2A}$ .

Para corroborar la acción secuencial de los receptores se realizaron los mismos experimentos utilizando agonistas selectivos para cada receptor  $A_1$  y  $A_{2A}$  (CCPA y CGS21680 respectivamente). La aplicación de CCPA disminuyó la  $ICa^{2+}$  en la misma proporción que las bajas concentraciones de adenosina:  $25 \pm 4\%$  ( $n = 13$ ;  $P < 0.01$  ANOVA de Kruskal-Wallis). La posterior administración de CGS 21680, en presencia de CCPA, aumentó la corriente revirtiendo el efecto del CCPA:  $23 \pm 4\%$  ( $n = 7$ ,  $P < 0.05$ ; ver Figuras. 11 A y B). Esta reversión sólo se observó en el 54% de las neuronas registradas, lo que sugiere que sólo las neuronas de una de las vías está siendo afectada, i.e.: la indirecta. En el 46% de las neuronas no se observa el efecto mediado por los receptores a adenosina  $A_{2A}$ . Lo cual sugiere que se trata de neuronas de la vía directa.

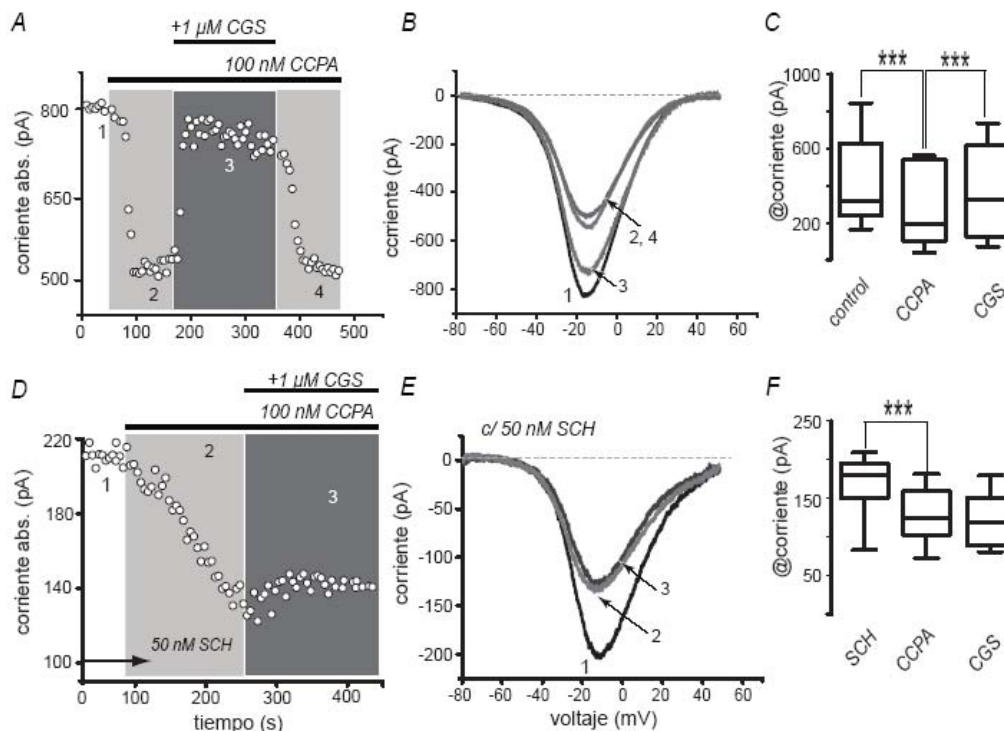
La figura 11C resume los resultados de esta serie de experimentos en diagramas de Tukey (mediana y rango 25-75): control: 315 (239 - 628) pA; CCPA: 197 (103 - 539) pA; CGS 21680: 328 (124 - 115) pA. Estos cambios fueron significativos ( $P < 0.0001$ ; ANOVA de Kruskal-Wallis y Post hoc de Dunns).



**Figura 10 Efecto bifásico de la adenosina dependiente de la concentración sobre la  $ICa^{2+}$ .** A: La adición de 100 nM de adenosina disminuye la amplitud de corriente, mientras que la aplicación de 10  $\mu M$  revirtió parcialmente la disminución de la corriente producida por las concentraciones bajas de adenosina. B): Curvas I-V representativas tomadas del curso temporal de la figura A como indican los números. C) Resumen de la estadística muestral ( $n = 13$ ). D) El curso temporal muestra que la reducción en la corriente producida por bajas concentraciones de adenosina no fue bloqueado por el antagonista a los receptores  $A_{2A}$  (50 nM SCH 58261), mientras que la reversión a altas concentraciones de adenosina fue bloqueado. E Curvas I-V representativas tomadas del curso temporal de la figura D como indican los números. F: Resumen estadístico con gráficas de Tukey ( $n = 13$ ).

Para confirmar que el incremento en la  $ICa^{2+}$  se debió a la activación de los receptores  $A_{2A}$  se administró el antagonista selectivo a receptores tipo  $A_{2A}$  (50 nM de SCH 58261). Las figuras 11 D, E y F muestran que la aplicación del agonista  $A_1$  sigue disminuyendo la corriente:  $22\% \pm 3\%$  ( $n = 8$ ;  $P < 0.0001$ ), mientras que la aplicación del agonista de los receptores  $A_{2A}$  (1  $\mu M$ ) en estas condiciones ya no tuvo efecto debido a la presencia del antagonista. Lo que confirma el incremento en la corriente al aplicar CGS 21680 es debido a la activación del receptor  $A_{2A}$ .

La figura 11 F ilustra la estadística de esta serie de experimentos (mediana y rango con percentiles 25-75). Control: 181 (132 - 193) pA; CCPA: 126 (107 - 161) pA; CGS 21680: 125 (89 - 158) pA. Estos cambios fueron significativos ( $P < 0.0001$ ; ANOVA de Kruskal-Wallis y Post hoc de Dunns).



**Figura 11. Activación secuencial de los receptores de tipo  $A_1$  y  $A_{2A}$  con agonistas selectivos.** A) Curso temporal de la amplitud de corriente que demuestra que CCPA (100 nM) disminuye la amplitud de la corriente (1, 2). La subsecuente aplicación de 1  $\mu$ M CGS 21680 (2, 3) revierte casi por completo la reducción inducida por el CCPA. Este efecto se observa en aproximadamente la mitad de las neuronas registradas. B) Curvas I-V representativas tomadas del curso temporal de la figura en A. Los números indican el orden de aplicación. C) La gráfica ilustra los resultados de una muestra de neuronas ( $n = 13$ ). D) Curso temporal similar a la figura en A, pero en presencia de 50 nM del antagonista de los receptores  $A_{2A}$ -SCH 58261. En estas condiciones, el efecto de CGS 21680 no se pudo observar en ninguna neurona registrada. E: Curvas I-V representativas tomadas del curso temporal en D. F) Resumen de los resultados en una muestra de neuronas ( $n = 8$ ).

Los resultados expuestos permiten inferir que existe una modulación de la  $ICa^{2+}$  en neuronas estriatales. Está modulación es mediada de manera secuencial por los receptores a adenosina de los tipos  $A_1$  y  $A_{2A}$ : primero, el receptor  $A_1$  reduce la

corriente, después el receptor  $A_{2A}$  revierte dicha reducción, por lo tanto aumenta y recupera la corriente. Como el agonista  $A_{2A}$  no actúa solo, deducimos que el receptor  $A_1$  permite o habilita al receptor  $A_{2A}$ . Sin embargo, desconocemos qué tipo de canales de calcio están involucrados en el decremento y en el incremento de esta modulación. No sabemos, por ejemplo, si esta modulación es de tipo antagónica es decir que la acción final de ambos receptores sea sobre el mismo canal de calcio. Para responder a esta pregunta se realizaron experimentos en presencia de bloqueadores selectivos de los canales de calcio.

Las figuras 12 A y B muestran que de la aplicación de nicardipina disminuye la  $ICa^{2+}$  un  $58 \pm 4\%$  ( $n = 13$   $P < 0.0001$ ). Si ahora se aplica el agonista  $A_1$ , 100 nM CCPA, este disminuye la corriente aun más:  $39 \pm 10\%$  ( $n = 13$ ;  $P < 0.0001$  ANOVA de Kruskal-Wallis y Post hoc de Dunns). Sin embargo la subsecuente aplicación del agonista  $A_{2A}$ , 1  $\mu$ M CGS 21680, ya no consigue recuperar la corriente ( $n = 13$ ; ANOVA Kruskal-Wallis y Post hoc de Dunns  $P < 0.0001$ ). Estos resultados permiten inferir: a) que los receptores  $A_{2A}$  modulan (incrementan) la corriente acarreada por los canales de calcio de tipo  $Ca_v1$ , y b) que los receptores  $A_1$  modulan (disminuyen) la corriente llevada por otros canales. Esto es, los efectos no son sobre el mismo efector y no son antagónicos de manera directa (sobre el mismo blanco molecular).

De manera similar se procedió a activar a los receptores de adenosina  $A_1$  y  $A_{2A}$  de manera secuencial pero ahora con bajas y altas concentraciones de adenosina (Figura 12 D y E). La aplicación de la dihidropiridina redujo la corriente un  $41 \pm 4\%$  ( $n = 12$ ;  $P < 0.05$ , ANOVA Kruskal-Wallis y Post hoc de Dunns). La subsecuente aplicación de bajas concentraciones de adenosina (100

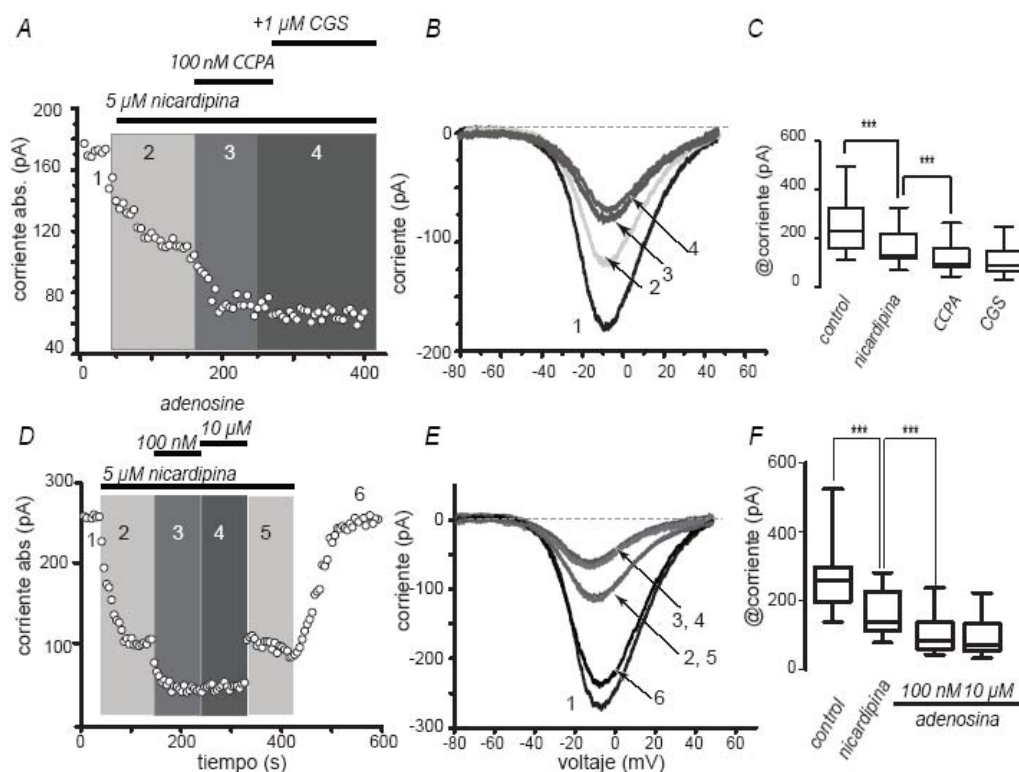
nM) disminuyeron la corriente aun más:  $20 \pm 2\%$  ( $n = 12$ ;  $P < 0.05$  ANOVA Kruskal-Wallis y Post hoc de Dunns), por lo que corroboramos que la disminución no involucra a los canales  $Ca_v1$ . Al adicionar concentraciones altas de adenosina ( $10 \mu\text{M}$ ), estas no tuvieron efecto en presencia de la dihidropyridina ( $n = 12$ ;  $P < 0.05$  ANOVA Kruskal-Wallis y Post hoc de Dunns). Esto corrobora que las dosis altas actúan sobre el receptor  $A_{2A}$  que a su vez modula a los canales  $Ca_v1$ .

Nos preguntamos qué canales llevan la corriente modulada por el receptor de tipo  $A_1$ . Para responder esta pregunta se realizó una estrategia similar: en presencia de los bloqueadores de los canales de calcio de tipo  $Ca_v2.2$  (N) con  $\omega$ -Conotoxina GVIA a  $1\mu\text{M}$ . Las Figuras 13 A y B ilustran que la aplicación de los bloqueadores de los canales de calcio de tipo  $Ca_v2.2$  reducen la corriente un  $20 \pm 3\%$ . ( $n = 9$ ;  $P < 0.0001$ ) y que ante la subsecuente aplicación de bajas concentraciones de adenosina ( $100 \text{ nM}$ ) ya no se observa ningún cambio en la amplitud de la corriente. Esto sugiere la acción del receptor  $A_1$  es mediada por los canales de calcio  $Ca_v2.2$ .

El mismo tipo de experimentos se realizaron en presencia de un bloqueador de los canales de calcio  $Ca_v 2.1$  (P/Q) con  $1 \mu\text{M}$  de  $\omega$ -Agatoxina (Figura 13 D-F). Este bloqueador no inhibió la acción de los receptores de tipo  $A_1$ .

Por último se ha demostrado en otras células (Gundlfinger et al., 2007; Noguchi y Yamashita, 2000) que los receptores de tipo  $A_1$  pueden modular a los  $Ca_v 2.2$  y  $Ca_v 2.1$  por medio de un vía de delimitada membrana y dependiente de voltaje. Es decir que no requiere de una cadena de señalización citosólica. Por lo tanto,

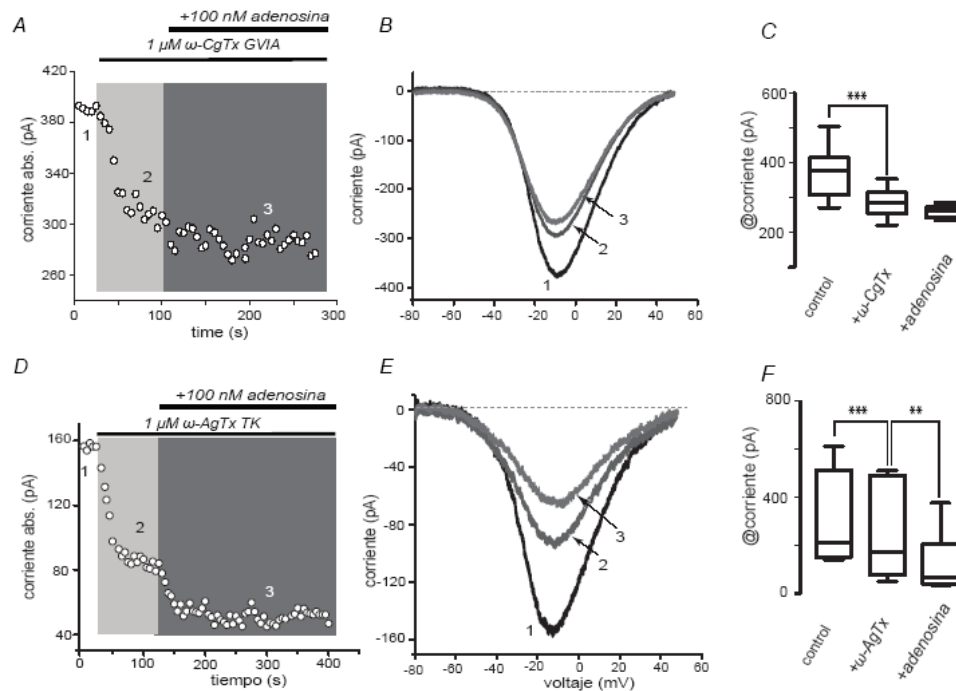
para determinar si la acción de los receptores de adenosina tipo  $A_1$  es dependiente o independiente de voltaje se realizó el protocolo de doble pulso (ver materiales y métodos).



**Figura 12. El efecto de los receptores  $A_{2A}$  es bloqueado en presencia de un bloqueador de los canales de calcio  $Ca_v1$  (L).** A) El curso temporal ilustra la reducción de la corriente al aplicar CCPA. Posteriormente, la acción del agonista del receptor  $A_{2A}$  es abolida por la nicardipina. B: Curvas I-V representativa del curso temporal de los experimentos, los números indican el orden de aplicación de cada fármaco. C) Se ilustra una muestra de experimentos similares ( $n = 10$  para control,  $n = 6$  para la nicardipina, CCPA y CGS  $P < 0.0001$ ). D) Curso temporal de un experimento representativo donde se muestra que  $5 \mu\text{M}$  nicardipina ocluye la acción de altas concentraciones pero no bajas concentraciones de adenosina. E) Curvas I-V representativas tomadas del curso temporal de la figura D; los números señalan el orden de aplicación de fármaco. F) Se ilustra una muestra de experimentos en estas condiciones ( $n = 12$ ;  $P > 0.0001$ ).

La figura 14 A muestra que bajo este protocolo, el agonista selectivo para los receptores a adenosina de tipo  $A_1$  (CCPA  $100 \text{ nM}$ ) ejerce la misma modulación antes y después de un pre-pulso a  $+80 \text{ mV}$ , lo cual sugiere que la modulación no es mediada por un mecanismo delimitado a membrana dependiente de voltaje: la

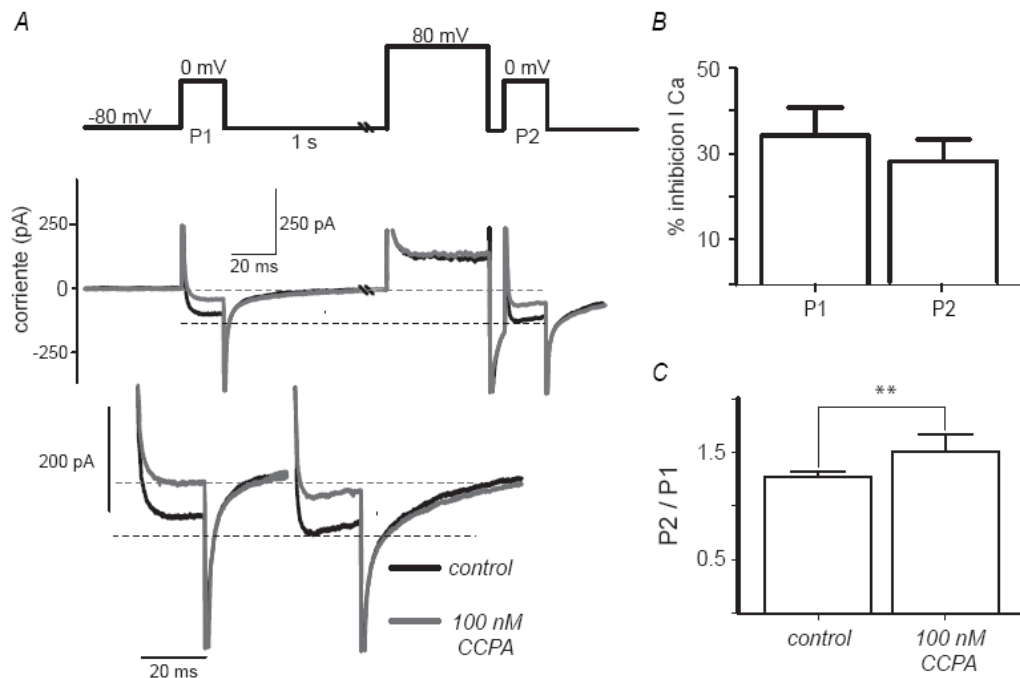
modulación antes del pre-pulso fue de  $35 \pm 6\%$  y después del pre-pulso fue de  $28 \pm 5\%$  (mediana = %,  $n = 10$ ; NS, Wilcoxon, Figura, 14 A-C).



**Figura 13 La activación del receptor de adenosina  $A_1$  modula canales de calcio de tipo  $Ca_v2.2$  (N).** A) Curso temporal que ilustra que  $1 \mu\text{M}$  de  $\omega$ -conotoxina GVIA bloquea la acción de  $100 \text{ nM}$  de adenosina. B) Curvas I-V representativas tomadas del curso temporal en A como se indica con números. C) Resumen de una muestra de experimental ( $n = 9$ ;  $P < 0.0001$ ) D) El curso temporal ilustra que  $1 \mu\text{M}$  de  $\omega$ -agatoxina IVA no bloquea la acción de  $100 \text{ nM}$  de adenosina. E) Curvas I-V representativas tomadas del curso temporal. F) Resumen de la muestra ( $n = 6$ ;  $P < 0.0001$ ).

Los experimentos y resultado sugieren que los receptores a adenosina,  $A_1$  y  $A_{2A}$ , modulan diferentes canales de calcio, la corriente que se reduce no es la misma que se incrementa, respectivamente. En ambos casos las cascadas de señalización involucran mensajeros intracelulares. Mientras las acciones del receptor  $A_1$  se observan en todas las neuronas registradas, las acciones del receptor a adenosina de tipo  $A_{2A}$  sólo se observa en el 50% de las mismas (vía indirecta; Yabuuchi et al., 2006).



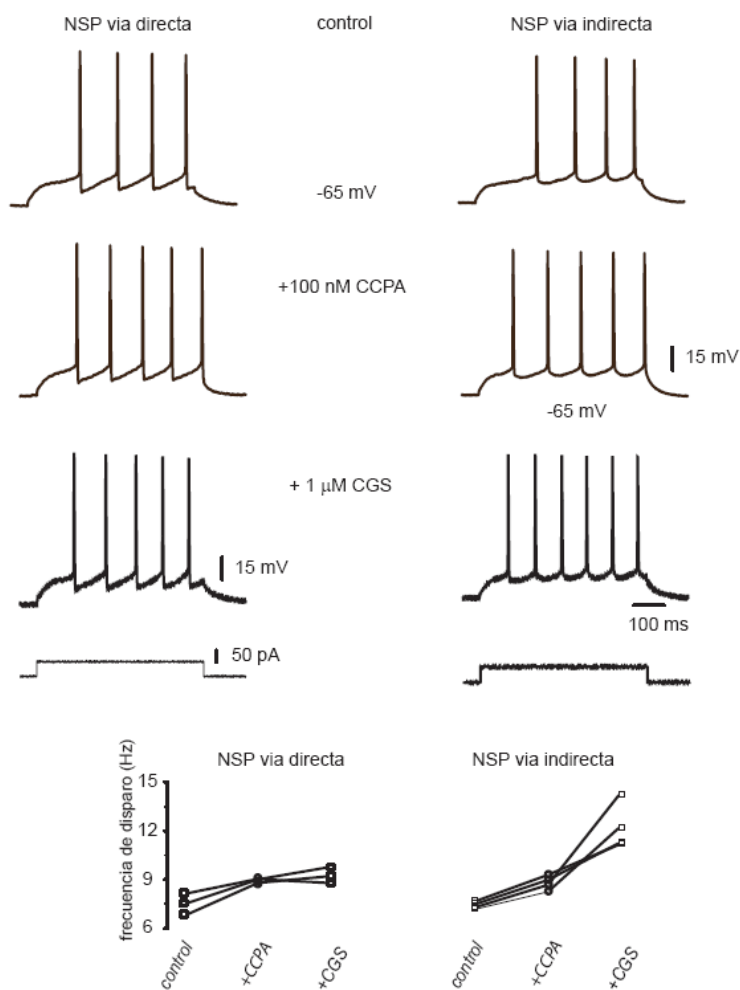


**Figura 14. La modulación debida a los receptores a adenosina de tipo A1 es independiente de voltaje.** A) Protocolo de doble pulso estándar. La figura de en medio muestra las corrientes generadas antes (trazo negro) y después (trazo gris) de la aplicación de CCPA y antes y después del comando a 80 mV. El incremento o cambio de amplitud y de la cinética de la corriente durante sugiere una acción constitutiva de la proteína G. B) Sin embargo, el porcentaje de modulación antes y después de la pre-pulso 80 mV no fue significativamente diferente. C) La relación entre el segundo y el primer comandos fue ligeramente diferente. Este resultado sugiere que la modulación de los receptores A1 es principalmente independiente de voltaje.

Es sabido que la modulación de los canales  $Ca_v2.1$  y  $Ca_v2.2$  regulan las corrientes de potasio activadas por calcio y por ende al postpotencial hiperpolarizante (PPH). Reducir la entrada de calcio por estos canales incrementa la frecuencia de disparo de las NEMs del NSt (Vilchis et al., 2000; Perez-Garci et al., 2003; Perez-Rosello et al., 2005).

Para corroborar la relación entre corrientes de calcio y excitabilidad la figura 15 se muestran los experimentos en registros intracelulares. Con ellos confirmamos que al activar a los receptores a adenosina de tipo  $A_1$  se incrementa de manera significativa el disparo neuronal en todas las neuronas registradas.

Note que al activar de manera secuencial al receptor a adenosina de tipo  $A_{2A}$ , se incrementa aun más el disparo neuronal. Esto último es debido que estos receptores están involucrados con el incremento de la corriente de calcio por los canales tipo  $Ca_v1$ . Estos canales participan amplificando la despolarización producida por un estímulo (Vilchis et al., 2000; Perez-Garci et al., 2003). Por ello, la acción de ambos receptores en las neuronas de la vía indirecta se suma.



**Figura 15. Los receptores  $A_1$  y  $A_{2A}$  tienen efectos sinérgicos sobre la excitabilidad en la mitad de las neuronas estriatales de proyección (vía indirecta).** A) Las columnas izquierda y derecha ilustran el disparo de NEMs de las vía directa e indirecta, respectivamente. En el control se provocó el disparo del mismo número de potenciales de acción en ambas. La adición de CCPA (100 nM) aumentó el número de espigas en ambas neuronas. La adición subsecuente de CGS 21680 (1 μM) aumentó aún más el número de espigas solo en las NEMs de la vía indirecta. La gráfica inferior muestra el comportamiento de 7 neuronas: todas respondían a CCPA, pero sólo 4 de cada 7 neuronas respondían a CGS.

## 8. DISCUSION

En la presente tesis demostramos que la activación secuencial de los receptores de adenosina de los tipos  $A_1$  y  $A_{2A}$  en las neuronas estriatales de proyección produce importantes acciones sobre los canales de calcio dependientes de voltaje. Se demostró que los receptores  $A_1$  modulan los canales de calcio de tipo  $Ca_v2.2$  en todas las neuronas, esto es, en ambas vías directa e indirecta. Este efecto es el de disminuir la corriente. Pero en la mitad de las neuronas, también se modulan los canales de la clase  $Ca_v1$ . Según la literatura esto se debe a que la vía indirecta expresa los receptores  $A_{2A}$  (Kull et al., 1999; 2000; Yabuuchi et al., 2006). Esto produce una acción sinérgica en la excitabilidad de estas neuronas; un proceso fisiológico que antes no se había explicado.

Otro punto importante es que para activar los receptores  $A_{2A}$ , tienen que activarse primero los  $A_1$ . De alguna manera que hay que investigar, un receptor habilita al otro. La activación secuencial produce un efecto bifásico en la corriente total: primero se reduce (receptor  $A_1$ ) y luego se revierte esta reducción recuperando su amplitud original (receptor  $A_{2A}$ ). Pero al suceder esto, los canales de la neurona se reconfiguran: se pierde un porcentaje de la corriente acarreada por el canal  $Ca_v2.2$ , y se gana un porcentaje de la corriente llevada por el canal  $Ca_v1$ . Ambos efectos favorecen la excitabilidad de las neuronas: la reducción de la corriente  $Ca_v2.2$  evita la activación de las corrientes de  $K^+$  activadas por  $Ca^{2+}$ , lo que aumenta la frecuencia de disparo (Vilchis et al., 2000; Perez-Garci et al., 2003). El aumento en la corriente  $Ca_v1$  amplifica la despolarización debida a los estímulos, lo que también aumenta el disparo.

Antes de este trabajo, el aumento en la excitabilidad de la vía indirecta se atribuía exclusivamente a la ausencia de dopamina.

Existen dos maneras de liberar adenosina al medio extracelular. Una de ellas es mediada por transportadores de nucleósidos (Lloyd y Schrader., 1989 Meghji., 1993) y la otra se debe a la acción de las ectonucleotidasas (Franco et al., 1998). Estas formas de regular la concentración de adenosina están reguladas por el estado excitable de las células. Es decir, si la excitabilidad es baja, la liberación es preferentemente mediante transportadores, manteniendo una concentración basal de entre 40 y 120 nM. Esto quiere decir que el receptor  $A_1$  está parcialmente ocupado en ambas neuronas y regulando la excitabilidad junto con otros moduladores como la acetil-colina y la dopamina.

Sin embargo, al incrementarse la actividad neuronal la concentración de adenosina aumenta hasta el orden de las micromolas por la acción de las ectonucleotidasas. Mostramos que a bajas concentraciones de adenosina se estimulan primordialmente los receptores de tipo  $A_1$  mientras que a altas concentraciones se activan a los receptores de tipo  $A_{2A}$  es decir que la activación de estos receptores depende de la concentración de adenosina.

Por otra parte, experimentos bioquímicos han sugerido que las vías de señalización por la cual los receptores de adenosina ejercen su acción sobre los canales de calcio u otros blancos moleculares son diferentes: los receptores  $A_1$  activan a una proteína  $G_i$  mientras los receptores  $A_{2A}$  activan a una proteína  $G_s$ . Esto es, utilizan vías similares a las usadas por los receptores de dopamina de los tipos tipo  $D_2$  y  $D_1$ , respectivamente. Sin embargo, los receptores a dopamina se encuentran en diferentes tipo neuronales ( $D_2$  en vía indirecta y  $D_1$  en vía

directa) y se sabe que los receptores  $D_2$  disminuyen, no aumentan la excitabilidad en la vía directa, así se pone en evidencia que aunque las vías de señalización sean similares el resultado final sobre el efector es diferente.

Anteriormente, se había demostrado que los canales de calcio son modulados por los receptores de adenosina pero estos trabajos solo activaron un receptor, en nuestro caso demostramos que los receptores de adenosina modulan a diferentes canales de calcio y la secuencia con la cual se activen da como resultado acciones aditivas en el disparo neuronal.

El único antecedente similar a estos resultados es el reporte de que la liberación de glutamato disminuye al activar el receptor  $A_1$  y aumenta al activar al receptor  $A_{2A}$ . Pero nunca se habían observado las acciones de ambos receptores sobre las corrientes de calcio en la misma neurona (Ciruela et al 2006)

La oposición aparente que se observa a nivel de las corrientes de calcio lleva a un efecto sinérgico en la excitabilidad de las neuronas espinosas medianas de la vía indirecta, tal como lo muestran los experimentos de fijación de corriente.

Sin embargo, hay que recalcar que estas acciones son en el soma de la neurona donde se generan los potenciales de acción dependientes de sodio, habría que realizar experimentos para dilucidar que ocurre en las dendritas y espinas adonde llegan las entradas sinápticas.

La importancia funcional es que en modelos de la enfermedad de Parkinson las neuronas espinosas medianas de la vía indirecta se encuentran hiperexcitadas, este fenómeno puede deberse en parte a las propiedades intrínsecas de la neurona y a la falta de dopamina, sin embargo, el aumento de adenosina en el

medio podría coadyuvar. Lo que apoyaría el uso de antagonistas del receptor de tipo  $A_{2A}$  en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (EP).

Este tratamiento no ha sido muy exitoso como monoterapia en la práctica clínica a pesar de que la cafeína (antagonista inespecífico si tiene efectos). Pero entre nuestros resultados observamos que el receptor  $A_{2A}$  necesita ser habilitado por la previa activación del receptor  $A_1$ . Entonces, como perspectivas de este trabajo surgen varias preguntas: ¿sólo el receptor  $A_1$  puede habilitar a los receptores  $A_{2A}$ ? Imaginemos que también los receptores  $D_2$  pudiesen habilitarlo. Aquí la terapéutica caería en una contradicción, pues entre los fármacos más usados para la terapia médica de la EP están los agonistas dopaminérgicos a los receptores de la clase  $D_2$ . Si la excitabilidad está muy aumentada, se facilitaría la activación de los receptores  $A_{2A}$  contrarrestando los efectos de los agonistas  $D_2$ . Esto es, si nuestros resultados se repiten en un modelo animal de la EP, podríamos sugerir que los antagonistas  $A_{2A}$  deben de usarse junto con los agonistas  $D_2$ .

Se sabe que las neuronas de la vía directa expresa solo el receptor de adenosina tipo  $A_1$  mientras que la vía indirecta expresa ambos tipos de receptores de adenosina y son estas últimas las que están involucradas con el incremento de la excitabilidad durante la enfermedad de Parkinson. Las neuronas de la vía directa en realidad se supone que decrementan su excitabilidad. La acción de la denomina en este caso sería apagarlas más. Por lo que otra pregunta relevante es si no se necesitaría utilizar antagonistas para ambos receptores.

## 9. CONCLUSIONES

- La activación de los receptores purinérgicos tipo  $A_{2A}$  aumenta la corriente de calcio siempre y cuando estén ocupados y activados los receptores  $A_1$ .
- El receptor  $A_1$  es más sensible a la acción del agonista endógeno.
- La acción de los receptores de adenosina es dosis dependiente.
- El aumento de la corriente de calcio es debido a la activación de los receptores  $A_{2A}$ . es en realidad una “recuperación” de la disminución causada por los receptores tipo  $A_1$ .
- Los receptores de adenosina modulan diferentes canales de calcio dependientes de voltaje:
  - La acción de los receptores de adenosina tipo  $A_{2A}$  es sobre los canales dependientes de voltaje tipo L,
  - La acción de los receptores de adenosina tipo  $A_1$  es sobre los canales dependientes de voltaje tipo N.
- La acción de los receptores  $A_{2A}$  sólo se observa en la mitad de las neuronas espinosas medianas registradas.
- La acción de los receptores purinérgicos es a través de un vía de señalización de segundos mensajeros.

## 10. REFERENCIAS

- Akbar M., Okajima F., Tomura H., Shimegi S. and Kondo Y. (1994). A single species of A1 adenosine receptor expressed in Chinese hamster ovary cells not only inhibits cAMP accumulation but also stimulates phospholipase C and arachidonate release. *Molecular pharmacology* 45, 1036-1042.
- Albin R, Young A, Penney J. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12:366-375.
- Alexander G, Crutcher M. (1990). Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci* 13: 266-271.
- Alexander G, DeLong M, Strick P. (1986). Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurosci* 9: 357-381.
- Ambrosio, A.F., Malva, J.O., Carvalho, A.P., and Carvalho, C.M. (1997). Inhibition of N-,P/Q- and other types of Ca<sup>2+</sup> channels in rat hippocampal nerve terminals by the adenosine A1 receptor. *European journal of pharmacology* 340, 301-310
- Anand-Srivastava MB, Cantin M, Ballak M, Picard S. (1989) Desensitization of the stimulatory A2 adenosine receptor-adenylate cyclase system in vascular smooth muscle cells from rat aorta. *Mol Cell Endocrinol.* 62(2):273-9.
- Antle MC, Steen NM and Mistlberger RE (2001) Adenosine and caffeine modulate circadian rhythms in the Syrian hamster. *Neuroreport* 12:2901-2905.
- Aosaki T, Miura M, Suzuki T, Nishimura K, Masuda M. (2010) Acetylcholine-dopamine balance hypothesis in the striatum: an update. *Geriatr Gerontol Int.* Suppl 1:S148-57.
- Arch JR, Newsholme EA. (1978) Activities and some properties of 5'-nucleotidase, adenosine kinase and adenosine deaminase in tissues from vertebrates and invertebrates in relation to the control of the concentration and the physiological role of adenosine. *Biochem J.*174(3):965-77.
- Archer RG, Pitelka V, Hammond JR. (2004) Nucleoside transporter subtype expression and function in rat skeletal muscle microvascular endothelial cells. *Br J Pharmacol.* 143(1):202-14.
- Arikkath J, Campbell KP (2003) Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr Opin Neurobiol* 13:298-307.
- Baik JH, Picetti R, Saiardi A, Thiriet G, Dierich A, Depaulis A, Le Meur M, Borrelli E.(1995) Parkinsonian-like locomotor impairment in mice lacking dopamine D2 receptors. *Nature.* 5;377(6548):424-8.



Bargas J, Galarraga E, Aceves J (1989) An early outward conductance modulates the firing latency and frequency of neostriatal neurons of the rat brain. *Exp Brain Res* 75:146-156.

Bargas J, Howe A, Eberwine J, Cao Y, Surmeier DJ (1994) Cellular and molecular characterization of Ca<sup>2+</sup> currents in acutely isolated, adult rat neostriatal neurons. *J Neurosci* 14:6667-6686.

Barrie, A.P., and Nicholls, D.G. (1993). Adenosine A1 receptor inhibition of glutamate exocytosis and protein kinase C-mediated decoupling. *Journal of neurochemistry*. 60, 1081-1086.

Barrington WW, Jacobson KA, Stiles GL. (1990) Glycoprotein nature of the A2-adenosine receptor binding subunit. *Mol Pharmacol*. 38(2):177-83.

Berne RM, Knabb RM, Ely SW and Rubio R (1983) Adenosine in the local regulation of blood flow: a brief overview. *Fed Proc* 42:3136-3142.

Bjorness TE, Kelly CL, Gao T, Poffenberger V and Greene RW (2009) Control and function of the homeostatic sleep response by adenosine A1 receptors. *J Neurosci* 29:1267-1276.

Boison D, Chen JF, Fredholm BB. (2010) Adenosine signaling and function in glial cells. *Cell Death Differ* 17(7):1071-82.

Boland LM, Allen AC, Dingledine R (1991) Inhibition by bradykinin of voltage-activated barium current in a rat dorsal root ganglion cell line: role of protein kinase C. *J Neurosci* 11:1140-1149.

Bouvier M., Loisel T. P., Hebert T. E. (1995). Dynamic regulation of G-protein coupled receptor palmitoylation: potential role in receptor function. *Biochem. Soc. Trans.* 23:577-581.

Brody DL, Patil PG, Mulle JG, Snutch TP, Yue DT (1997) Bursts of action potential waveforms relieve G-protein inhibition of recombinant P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels in HEK 293 cells. *J Physiol* 499.3:637-644.

Brown DA, Sihra TS (2008) Presynaptic signaling by heterotrimeric G-proteins. *Handb Exp Pharmacol* 184:207-60.

Brown RM and Short JL (2008) Adenosine A(2A) receptors and their role in drug addiction. *J Pharm Pharmacol* 60:1409-1430.

Burnstock G (2009) Purinergic receptors and pain. *Curr Pharm Des* 15:1717-1735.

Calabresi P, Picconi B, Tozzi A, Ghiglieri V, Di Filippo M. (2014) Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. *Nat Neurosci.* 2014 (8):1022-30.

Canals M, Angulo E, Casado V, Canela EI, Mallol J, Vinals F, Staines W, Tinner B, Hillion J, Agnati L, Fuxe K, Ferre S, Lluís C and Franco R (2005) Molecular mechanisms involved in the adenosine A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> receptor-induced neuronal differentiation in neuroblastoma cells and striatal primary cultures. *J Neurochem* 92:337-348.

Canals M, Marcellino D, Fanelli F, Ciruela F, de Benedetti P, Goldberg SR, Neve K, Fuxe K, Agnati LF, Woods AS, Ferré S, Lluís C, Bouvier M, Franco R.(2003) Adenosine A<sub>2A</sub>-dopamine D<sub>2</sub> receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J Biol Chem.*278(47):46741-9.

Catterall WA (2000) Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:521-555.

Catterall WA, Few AP (2008) Calcium channel regulation and presynaptic plasticity. *Neuron* 59:882-901.

Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J (2005) International Union of Pharmacology XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of Voltage-Gated Calcium Channels. *Pharmacol Rev* 57:411-425.

Chishty M, Begley DJ, Abbott NJ, Reichel A. (2003) Functional characterisation of nucleoside transport in rat brain endothelial cells. *Neuroreport.* 14(7):1087-90.

Ciruela F, Casadó V, Rodrigues RJ, Luján R, Burgueño J, Canals M, Borycz J, Rebola N, Goldberg SR, Mallol J, Cortés A, Canela EI, López-Giménez JF, Milligan G, Lluís C, Cunha RA, Ferré S, Franco R. (2006). Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A<sub>1</sub>-A<sub>2A</sub> receptor heteromers. *J Neurosci.* 26(7):2080-7

Ciruela F., Saura C., Canela E. I., Mallol J., Lluís C. and Franco R. (1996). Adenosine deaminase affects ligand-induced signalling by interacting with cell surface adenosine receptors. *FEBS Lett.*380:219-223.

Civelli O1, Bunzow JR, Grandy DK. (1993) Molecular diversity of the dopamine receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 33:281-307.

Clapham DE, Neer EJ (1997) G proteins  $\beta\gamma$  subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:167-203.

Cools A. (1984). Basal ganglia and Parkinson's disease: neurobiological and pharmacological aspects in animals and man. *Clin Neurol Neurosurg* 86:178-195.

Cunha-Reis D, Fontinha BM, Ribeiro JA, Sebastião AM. (2007) Tonic adenosine A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> receptor activation is required for the excitatory action of VIP on synaptic transmission in the CA1 area of the hippocampus. *Neuropharmacol* 52(2): 313–320.

Cunha-Reis D, Ribeiro JA, Sebastião AM. (2008) A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> receptor activation by endogenous adenosine is required for VIP enhancement of K<sup>+</sup>-evoked [3H]-GABA release from rat hippocampal nerve terminals. *Neurosci Lett* 430(3):207-12.

Del Tredici K, Braak H. Lewy pathology and neurodegeneration in premotor Parkinson's disease. (2012) *Mov Disord.* ;27(5):597-607.

Deussen A, Lloyd HG, Schrader J. (1989) Contribution of S-adenosylhomocysteine to cardiac adenosine formation. *J Mol Cell Cardiol.*(8):773-82.

Ding J.,Guzman J. N.,Tkatch T.,Chen S.,Goldberg J. A.,Ebert P. J.,Levitt P.,Wilson C. J.,Hamm H. E.,Surmeier D. J.(2006) RGS4-dependent attenuation of M4 autoreceptor function in striatal cholinergic interneurons following dopamine depletion. *Nat Neurosci.* 9, 832-42.

Doering CJ, Zamponi GW (2003) Molecular pharmacology of high voltage-activated calcium channels. *J Bioenerg Biomembr* 35:491-505.

Dohlman H. G., Caron M. G., Deblasi A., Frielle T. and Lefkowitz R. J. (1990). A role of extracellular disulfide bonded cysteines in the ligand binding function of the β<sub>2</sub> adrenergic receptor. *Biochem.* 29:2335-2342.

Dolphin AC and Archer ER. (1983). An adenosine agonist inhibits and a cyclic AMP analogue enhances the release of glutamate but not GABA from slices of rat dentate gyrus. *Neurosci Lett.* 43(1), 49-54

Dolphin AC, Forda SR, Scott RH.(1986) Calcium-dependent currents in cultured rat dorsal root ganglion neurones are inhibited by an adenosine analogue. *J Physiol.*373:47-61.

Dreyer JK. (2014) Three mechanisms by which striatal denervation causes breakdown of dopamine signaling. *J Neurosci.* 34(37):12444-56.

Dunwiddie TV, Masino SA. (2001) The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:31-55

Ferre S, Ciruela F, Borycz J, Solinas M, Quarta D, Antoniou K, Quiroz C, Justinova Z, Lluís C, Franco R, Goldberg SR. (2008) Adenosine A<sub>1</sub>-A<sub>2A</sub> receptor heteromers: new targets for caffeine in the brain. *Front Biosci*; 13:2391-9.

Ferre S, Fredholm BB, Morelli M, Popoli P and Fuxe K (1997) Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends Neurosci* 20:482-487.

Fink JS, Weaver DR, Rivkees SA, Peterfreund RA, Pollack AE, Adler EM, Reppert SM. (1992) Molecular cloning of the rat A2 adenosine receptor: selective co-expression with D2 dopamine receptors in rat striatum. *Brain Res Mol Brain Res*.14(3):186-95.

Fisher MN, Newsholme EA. (1984) Properties of rat heart adenosine kinase. *Biochem J*. 221(2):521-8.

Flores-Hernandez J., Cepeda C., Hernandez-Echeagaray E., Calvert C. R., Jokel E. S., Fienberg A. A., Greengard P., Levine M. S. (2002) Dopamine enhancement of NMDA currents in dissociated medium-sized striatal neurons: role of D1 receptors and DARPP-32. *J Neurophysiol* 88, 3010-20.

Fontinha BM, Delgado-Garcia JM, Madronal N, Ribeiro JA, Sebastiao AM and Gruart A (2009) Adenosine A(2A) receptor modulation of hippocampal CA3- CA1 synapse plasticity during associative learning in behaving mice. *Neuropsychopharmacology* 34:1865-1874.

Franco R., Valenzuela A., Lluís C. and Blanco J. (1998). Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes. *Immunol. Rev.* 161:27-42.

Franco R, Ferre S, Fuxe K. (2002) Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors. *J Biol Chem*. 277(20):18091-7.

Franco, R., Ciruela, F., Casado, V., Cortes, A., Canela, E.I., Mallol, J., Agnati, L.F., Ferre, S., Fuxe, K., and Lluís, C. (2005). Partners for adenosine A1 receptors. *J Mol Neurosci*. 26, 221-232.

Fredholm B.B., Abbracchio M.P., Burnstock G., Daly J.W., Harden K.T., Jacobson K.A., Leff P. and Willms M. (1994). Nomenclature and classification of purinoreceptors. *Pharmacol. Rev.*46, 143-156.

Fredholm BB, Arslan G, Halldner L, Kull B, Schulte G and Wasserman W (2000) Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 362:364-374.

Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. 2001 International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev.*;53(4):527-52.

Fredholm, B.B., and Dunwiddie, T.V. (1988). How does adenosine inhibit transmitter release? *Trends in pharmacological sciences*. 9, 130-134.

Freissmuth M, Selzer E, Schütz W. (1991) Interactions of purified bovine brain A1-adenosine receptors with G-proteins. Reciprocal modulation of agonist and antagonist binding. *Biochem J*; 275 ( Pt 3):651-6.

Freund, S., Ungerer, M., and Lohse, M.J. (1994). A1 adenosine receptors expressed in CHO-cells couple to adenylyl cyclase and to phospholipase C. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 350, 49-56.

Fuxe K, Ferre S, Genedani S, Franco R, Agnati L (2007). Adenosine receptor-dopamine receptor interactions in the basal ganglia and their relevance for brain function. *Physiology and Behavior* 92: 210-217.

Galarraga E, Bargas J, Sierra A, Aceves J (1989) The role of calcium in the repetitive firing of neostriatal neurons. *Exp Brain Res* 75:157-168.

Galarraga E, Hernández-López S, Tapia D, Reyes A, Bargas J (1999) Action of substance P (neurokinin-1) receptor activation on rat neostriatal projection neurons. *Synapse* 33:26-35.

Gerber U, Greene RW, Haas HL, Stevens DR. (1989) Characterization of inhibition mediated by adenosine in the hippocampus of the rat in vitro. *J Physiol*. 417:567-78.

Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ, Jr., Sibley DR (1990) D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250:1429-1432.

Gerwins P, Fredholm BB. (1995) Stimulation of adenosine A1 receptors and bradykinin receptors, which act via different G proteins, synergistically raises inositol 1,4,5-trisphosphate and intracellular free calcium in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89(16):7330-4.

Giasson BI, Lee VM. (2001) Parkin and the molecular pathways of Parkinson's disease. *Neuron*. 31(6):885-8

Girault J. A., Greengard P (2004). The neurobiology of dopamine signaling. *Arch Neurol* 61, 641-4.

Gonçalves, M.L., Pinto, F., and Ribeiro, J.A. (1991). Effect of adenosine on  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake by electrically stimulated rat brain synaptosomes. *Journal of neurochemistry*. 56, 1769-1773.

Graybiel A. (2008). Habits, rituals, and the evaluative brain. *Annu Rev Neurosci* 31:359-387.

Greene RW, Haas HL. (1991) The electrophysiology of adenosine in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol.* 36(4):329-41.

Greengard P (2001), The neurobiology of dopamine signaling. *Biosci Rep.*21(3):247-69.

Greengard P, Allen PB, Nairn AC.(1999) Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade. *Neuron.* 23(3):435-47.

Grillner S, Hellgren J, Menard A, Saitoh K, Wikstrom M. (2005). Mechanisms for selection of basic motor programs--roles for the striatum and pallidum. *Trends Neurosci* 28:364-370.

Gu JG, Foga IO, Parkinson FE, Geiger JD. (1995) Involvement of bidirectional adenosine transporters in the release of L-[3H]adenosine from rat brain synaptosomal preparations. *J Neurochem*; 64(5):2105-10.

Gundlfinger A, Bischofberger J, Jochenning FW, Torvinen M, Schmitz D and Breustedt J. (2007). Adenosine modulates transmission at the hippocampal mossy fibre synapse via direct inhibition of presynaptic calcium channels. *J Physiol.* 582, 263-77

Haas HL, Selbach O. (2000) Functions of neuronal adenosine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 362(4-5):375-81.

Hall KE, Browning MD, Dudek EM, Macdonald RL (1995) Enhancement of high threshold calcium currents in rat primary afferent neurons by constitutively active protein kinase C. *J Neurosci* 15:6069-6076.

Hernandez-Lopez S.,Bargas J.,Surmeier D. J.,Reyes A.,Galarraga E. (1997) D1 receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type Ca<sup>2+</sup> conductance. *J Neurosci*, 17, 3334-42.

Hernández-López, S., Tkatch, T., Pérez-Garci, E., Galárraga, E., Bargas, J., Hamm, H. and Surmeier, D. J. (2000) D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-Type Ca<sup>2+</sup> currents and excitability vía a novel PLCβ1–IP3–calcineurin-signaling cascade. *J Neurosci* 20 8987-8995.

Hernández-Flores T, Hernández-González O, Pérez-Ramírez MB, Lara-González E, Arias-García MA, Duhne M, Pérez-Burgos A, Prieto GA, Figueroa A, Galarraga E, Bargas J. (2014) Modulation of direct pathway striatal projection neurons by muscarinic M4-type receptors. *Neuropharmacology.* pii: S0028-3908(14)00346-3. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.09.028.

Hettinger BD, Lee A, Linden J, Rosin DL. (2001) Ultrastructural localization of adenosine A2A receptors suggests multiple cellular sites for modulation of GABAergic neurons in rat striatum. *J Comp Neurol.* 12;431(3):331-46.

Hibert M. F., Trumpp-Kallmeyer S., Bruinvels A., Hoflack J. (1991). Three-dimensional models of neurotransmitter G-binding protein-coupled receptors. *Mol. Pharmacol.* 40:8-15.

Hille B (2001) Modulation, slow synaptic action, and second messengers. In: *Ion channels of excitable membranes*, 3rd ed. (Sinauer), pp. 201-236 Sunderland.

Hillion J, Canals M, Torvinen M, Casado V, Scott R, Terasmaa A, Hansson A, Watson S, Olah ME, Mallol J, Canela EI, Zoli M, Agnati LF, Ibanez CF, Lluís C,

Hollins, C., and Stone, T.W. (1980). Adenosine inhibition of gamma-aminobutyric acid release from slices of rat cerebral cortex. *British journal of pharmacology.* 69, 107-112.

Hornykiewicz O. (2004) In *The history of neuroscience in autobiography*, Squire, L. R., Ed.; Elsevier, Academic press: Vol. 4, p 240-281.

Inoue M, Yoshii M (1992) Modulation of ion channels by somatostatin and acetylcholine. *Prog Neurobiol* 38:203-230.

Jenner P, Mori A, Hauser R, Morelli M, Fredholm BB and Chen JF (2009) Adenosine, adenosine A2A antagonists, and Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 15:406-413.

Jenner P. (2014). An Overview of Adenosine A2A Receptor Antagonists in Parkinson's Disease. *Int Rev Neurobiol.* 2014;119:71-86.

Jiang Q, Van Rhee AM, Kim J, Yehle S, Wess J, Jacobson KA.(1996) Hydrophilic side chains in the third and seventh transmembrane helical domains of human A2A adenosine receptors are required for ligand recognition. *Mol Pharmacol.* 50(3):512-21.

Jockers, R., Linder, M.E., Hohenegger, M., Nanoff, C., Bertin, B., Strosberg, A.D., Marullo, S., and Freissmuth, M. (1994). Species difference in the G protein selectivity of the human and bovine A1-adenosine receptor. *The Journal of biological chemistry* 269, 32077-32084.

Johansson B, Halldner L, Dunwiddie TV, Masino SA, Poelchen W, Gimenez-Llort Kawaguchi Y, Wilson CJ, Emson PC (1990) Projection subtypes of rat neostriatal matrix cells revealed by intracellular injection of biocytin. *J Neurosci* 10:3421-3438.

Johansson B, Halldner L, Dunwiddie TV, Masino SA, Poelchen W, Giménez-Llort L, Escorihuela RM, Fernandez-Teruel A, Wiesenfeld-Hallin Z, Xu XJ, Hardemark A, Betsholtz C, Herlenius E and Fredholm BB (2001) Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9407-9412.

Kebabian JW, Calne DB. (1979) Multiple receptors for dopamine. *Nature*. 277(5692):93-6.

Kimura, M., Saitoh, N., and Takahashi, T. (2003). Adenosine A(1) receptor-mediated presynaptic inhibition at the calyx of Held of immature rats. *The Journal of physiology* 553, 415-426.

Klinger M, Kuhn M, Just H, Stefan E, Palmer T, Freissmuth M, Nanoff C.(2002) Removal of the carboxy terminus of the A2A-adenosine receptor blunts constitutive activity: differential effect on cAMP accumulation and MAP kinase stimulation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 366(4):287-98.

Klotz K. N. and Lohse M. J. (1986). The glycoprotein nature of A1 adenosine receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 140:406-413.

Kringelbach M. L., Jenkinson N., Owen S. L., Aziz T. Z. (2007) Translational principles of deep brain stimulation. *Nat Rev Neurosci*, 8, 623-35.

Knapp CM, Foye MM, Cottam N, Ciraulo DA and Kornetsky C (2001) Adenosine agonists CGS 21680 and NECA inhibit the initiation of cocaine self-administration. *Pharmacol Biochem Behav* 68:797-803.

Kulisevsky J. Poyurovsky M. (2012) Adenosine A2A-Receptor Antagonism and Pathophysiology of Parkinson's Disease and Drug-Induced Movement Disorders. *Eur Neurol*;67:4–11

Kull B, Ferré S, Arslan G, Svenningsson P, Fuxe K, Owman C, Fredholm BB. (1999) Reciprocal interactions between adenosine A2A and dopamine D2 receptors in Chinese hamster ovary cells co-transfected with the two receptors. *Biochem Pharmacol*. 58(6):1035-45.

Kull B, Svenningsson P, Fredholm BB. (2000) Adenosine A<sub>2A</sub> receptors are colocalized with and activate G<sub>olf</sub> in rat striatum. *Mol Pharmacol* 58(4): 771–777.

Kunduri SS, Mustafa SJ, Ponnoth DS, Dick GM, Nayeem MA (2014) Adenosine A1 receptors link to smooth muscle contraction via CYP4a, PKC- $\alpha$ , and ERK1/2 *J Cardiovasc Pharmacol*.

Ladera, C., Godino, M.C., Martín, R., Luján, R., Shigemoto, M., Ciruela, F., Torres, M. and Sánchez-Prieto, J. (2007). The coexistence of multiple receptors in a single



nerve terminal provides evidence for presynaptic integration. *J. Neurochem.* 103, 2314–2326.

Latini S, Pedata F. (2001) Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J Neurochem.* 79(3):463-84.

Ledent C, Vaugeois JM, Schiffmann SN, Pedrazzini T, El Yacoubi M, Vanderhaeghen JJ, Costentin J, Heath JK, Vassart G, Parmentier M. (1997) Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor. *Nature.* 388(6643):674-8.

Lee FS, Chao MV. (2001) Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(6):3555-60.

Lees A. J., Hardy J., Revesz T. (2009) Parkinson's disease. *Lancet* 373, 2055-66.  
Li J. Y., Englund E., Holton J. L., Soulet D., Hagell P., Lees A. J., Lashley T., Quinn N. P., Rehn Crona S., Bjorklund A., Widner H., Revesz T., Lindvall O., Brundin P. (2008) Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat Med* 14, 501-3.

Löffler M, Morote-Garcia JC, Eltzhig SA, Coe IR, Eltzhig HK. (2007) Physiological roles of vascular nucleoside transporters. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*(5):1004-13.

Londos C, Cooper DM, Wolff J. (1980) Subclasses of external adenosine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.*77(5):2551-4.

Longordo F, Kopp C and Luthi A (2009) Consequences of sleep deprivation on neurotransmitter receptor expression and function. *Eur J Neurosci* 29:1810-1819.

Lopes LV, Cunha AR, Ribeiro JA. (1999) Cross talk between A(1) and A(2A) adenosine receptors in the hippocampus and cortex of young adult and old rats. *J Neurophysiol* 82(6): 3196-203

Maia L and de Mendonca A (2002) Does caffeine intake protect from Alzheimer's disease? *Eur J Neurol* 9:377-382.

Maldonado R, Blendy JA, Tzavara E, Gass P, Roques BP, Hanoune J and Schutz G (1996) Reduction of morphine abstinence in mice with a mutation in the gene encoding CREB. *Science* 273:657-659.

Manita, S., Kawamura, Y., Sato, K., Inoue, M., Kudo, Y. and Miyakawa, H. (2004). Adenosine A1-receptor mediated tonic inhibition of glutamate release at rat hippocampal CA3-CA1 synapses is primarily due to inhibition of N-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Eur. J. Pharmacol.* 499, 265–274.

Moore KA, Nicoll RA, Schmitz D.(2003) Adenosine gates synaptic plasticity at hippocampal mossy fiber synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*.100(24):14397-402.

Manzoni O, Pujalte D, Williams J and Bockaert J (1998) Decreased presynaptic sensitivity to adenosine after cocaine withdrawal. *J Neurosci* 18:7996-8002.

McCool BA, Farroni JS. (2001) A1 adenosine receptors inhibit multiple voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel subtypes in acutely isolated rat basolateral amygdala neurons. *Br J Pharmacol*. 132(4):879-88.

McIlwain H, Pull I. (1972) Release of adenine derivatives on electrical stimulation of superfused tissues from the brain. *J Physiol*. 221(1):9P-10P.

Meghji P, Skladanowski AC, Newby AC, Slakey LL, Pearson JD.(1993) Effect of 5'-deoxy-5'-isobutylthioadenosine on formation and release of adenosine from neonatal and adult rat ventricular myocytes. *Biochem J*.291:833-9.

Megson AC, Dickenson JM, Townsend-Nicholson A, Hill SJ. (1995) Synergy between the inositol phosphate responses to transfected human adenosine A1-receptors and constitutive P2-purinoceptors in CHO-K1 cells. *Br J Pharmacol*. ;115(8):1415-24.

Mendez I.,Vinuela A.,Astradsson A.,Mukhida K.,Hallett P.,Robertson H.,Tierney T.,Holness R.,Dagher A.,Trojanowski J. Q.,Isacson O. (2008) Dopamine neurons implanted into people with Parkinson's disease survive without pathology for 14 years. *Nat Med*, 14, 507-9.

Mercuri N. B.,Bernardi G. (2005) The 'magic' of L-dopa: why is it the gold standard Parkinson's disease therapy? *Trends Pharmacol Sci*. 26, 341-4.

Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG.(1998) Dopamine receptors: from structure to function *Physiol Rev*.78(1):189-225.

Morelli M, Carta AR, Jenner P (2009) Adenosine A2A receptors and Parkinson's disease. *Handb Exper Pharmacol*; 193: 589–615

Moreau JL, Huber G. (1999) Central adenosine A (2A) receptors: an overview. *Brain Res Brain Res Rev*. 31(1):65-82.

Mundell SJ, Luty JS, Willets J, Benovic JL, Kelly E. (1998) Enhanced expression of G protein-coupled receptor kinase 2 selectively increases the sensitivity of A2A adenosine receptors to agonist-induced desensitization. *Br J Pharmacol*. 125(2):347-56.

Munshi R, Pang IH, Sternweis PC, Linden J.(1991). A1 adenosine receptors of bovine brain couple to guanine nucleotide-binding proteins Gi1, Gi2, and Go. *J Biol Chem*. 266(33):22285-9.

Newman ME, Levitzki A.(1983) Desensitization of normal rat kidney cells to adenosine. *Biochem Pharmacol.* 32(1):137-40.

Nicola SM, Surmeier J, Malenka RC. Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. *Annu Rev Neurosci.* 2000;23:185-215.

Noguchi, J., and Yamashita, H. (2000). Adenosine inhibits voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> currents in rat dissociated supraoptic neurones via A1 receptors. *The Journal of physiology* 526, 313-326.

O'Kane EM, Stone TW.(1998) Interaction between adenosine A1 and A2 receptor-mediated responses in the rat hippocampus in vitro. *Eur J Pharmacol.* 362(1):17-25.

Olah M. E. (1995). Adenosine receptors: Protein and gene structure. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*329:135-150.

Olah ME.(1997) Identification of A2a adenosine receptor domains involved in selective coupling to Gs. Analysis of chimeric A1/A2a adenosine receptors. *J Biol Chem.*272(1):337-44.

Parkinson FE, Ferguson J, Zamzow CR, Xiong W. (2006) Gene expression for enzymes and transporters involved in regulating adenosine and inosine levels in rat forebrain neurons, astrocytes and C6 glioma cells. *J Neurosci Res.* 84(4):801-8.

Palmer TM, Stiles GL.(1997) Identification of an A2a adenosine receptor domain specifically responsible for mediating short-term desensitization. *Biochemistry.* 1997 Jan 28;36(4):832-8.

Patel MK1, Pinnock RD, Lee K.(2001) Adenosine exerts multiple effects in dorsal horn neurones of the adult rat spinal cord. *Brain Res.*920(1-2):19-26.

Perez-Garci E, Bargas J, Galarraga E (2003) The role of Ca<sup>2+</sup> channels in the repetitive firing of striatal projection neurons. *Neuroreport* 14:1253-1256.

Perez-Rosello T, Figueroa A, Salgado H, Vilchis C, Tecuapetla F, Guzman NJ, Galarraga E, Bargas J (2005) Cholinergic control of firing pattern and neurotransmission in rat neostriatal projection neurons: role of CaV2.1 and CaV2.2 Ca<sup>2+</sup> channels. *J Neurophysiol* 93:2507-2519.  
*Pharmacol.* 5(1):34-41.

Phillis JW, Edstrom JP, Kostopoulos GK and Kirkpatrick JR (1979) Effects of adenosine and adenine nucleotides on synaptic transmission in the cerebral cortex. *Can J Physiol Pharmacol* 57:1289-1312.

Pierce K. D., Furlong T. J., Selbie L. A. and Shine J. (1992). Molecular cloning and expression of an adenosine A2B receptors from human brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187:86-93.

Piersen CE, True CD, Wells JN.(1994) A carboxyl-terminally truncated mutant and nonglycosylated A2a adenosine receptors retain ligand binding. *Mol Pharmacol.* 45(5):861-70.

Podgorska M, Kocbuch K, Pawelczyk T. (2005) Recent advances in studies on biochemical and structural properties of equilibrative and concentrative nucleoside transporters. *Acta Biochim Pol;* 52(4):749-58.

Popoli P, Blum D, Domenici MR, Burnouf S and Chern Y (2008) A critical evaluation of adenosine A2A receptors as potentially "druggable" targets in Huntington's disease. *Curr Pharm Des* 14:1500-1511.

Ramkumar V, Olah ME, Jacobson KA, Stiles GL. (1991) Distinct pathways of desensitization of A1- and A2-adenosine receptors in DDT1 MF-2 cells. *Mol Pharmacol.* 40(5):639-47.

Ramukar V., Olah M. E., Jacobson K. A. and Stiles G. L. (1991). Distinct pathways of desensitization of A1and A2 adenosine receptors in DDT1MF-2 cells. *Mol. Pharmacol.*40:639-647.

Redgrave P, Vautrelle N, Reynolds JN. (2011). Functional properties of the basal ganglia's re-entrant loop architecture: selection and reinforcement. *Neuroscience.* 198:138–151

Reggio R, Pezzola A and Popoli P (1999) The intrastratial injection of an adenosine A(2) receptor antagonist prevents frontal cortex EEG abnormalities in a rat model of Huntington's disease. *Brain Res* 831:315-318.

Ribeiro JA, Sebastiao AM and de Mendonca A (2003) Participation of adenosine receptors in neuroprotection. *Drug News Perspect* 16:80-86.

Ribeiro JA, Sebastião AM, de Mendonça A. (2002) Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Prog Neurobiol.* 68(6):377-92.

Ribeiro JA, Sebastião AM. (2010) Caffeine and adenosine. *J Alzheimers Dis;*20 Suppl 1:S3-15.

Rivkees S. A., Barbhैया H. and AP I. J. (1999). Identification of the adenine binding site of the human A1 adenosine receptor. *J. Biol. Chem.* 274:3617-3621.

Rivkees SA, Price SL and Zhou FC (1995) Immunohistochemical detection of A1 adenosine receptors in rat brain with emphasis on localization in the hippocampal formation, cerebral cortex, cerebellum, and basal ganglia. *Brain Res* 677:193-203.

Rouse ST, Marino MJ, Bradley SR, Awad H, Wittmann M, Conn PJ. (2000) Distribution and roles of metabotropic glutamate receptors in the basal ganglia motor circuit: implications for treatment of Parkinson's disease and related disorders. *Pharmacol Ther.*88(3):427-35.

Ruiz M. A., Escriche M., Lluís C., Franco R., Martín M., Andrés A. and Ros M. (2000). Adenosine A1 Receptor in Cultured Neurons from Rat Cerebral Cortex: Colocalization with Adenosine Deaminase. *J. Neurochem.* 75:656-664.

Salamone JD, Correa M, Mingote SM, Weber SM. (2005) Beyond the reward hypothesis: alternative functions of nucleus accumbens dopamine. *Curr Opin*

Salgado H, Tecuapetla F, Perez-Rosello T, Perez-Burgos A, Perez-Garci E, Galarraga E, Vargas J (2005) A reconfiguration of  $Ca_v2$   $Ca^{2+}$  channel current and its dopaminergic  $D_2$  modulation in developing neostriatal neurons. *J Neurophysiol* 94: 3771-3787

Saransaari, P., and Oja, S.S. (2005). Characteristics of GABA release in mouse brain stem slices under normal and ischemic conditions. *Neurochemical research* 30, 1549-1556

Saura C. A., Mallol J., Canela E. I., Lluís C. and Franco R. (1998). Adenosine deaminase and A1 adenosine receptors internalize together following agonist-induced receptor desensitization. *J. Biol. Chem.*273:17610-17617.

Saura C., Ciruela F., Casadó V., Canela E. I., Mallol J., Lluís C. and Franco R. (1996). Adenosine deaminase interacts with A1 adenosine receptors in pig brain cortical membranes. *J. Neurochem.*66:1675-1682.

Schiffmann SN, Jacobs O, Vanderhaeghen JJ. (1991) Striatal restricted adenosine A2 receptor (RDC8) is expressed by enkephalin but not by substance P neurons: an in situ hybridization histochemistry study. *J Neurochem.* 57(3):1062-7.

Schiffmann SN, Libert F, Vassart G, Vanderhaeghen JJ. (1991) Distribution of adenosine A2 receptor mRNA in the human brain. *Neurosci Lett.*130(2):177-81

Schiffmann SN, Fisone G, Moresco R, Cunha RA, Ferré S. (2007) Adenosine A2A receptors and basal ganglia physiology. *Prog Neurobiol.* 83(5):277-92.

Scholz KP, Miller RJ. (1991) Analysis of adenosine actions on  $Ca^{2+}$  currents and synaptic transmission in cultured rat hippocampal pyramidal neurones. *J Physiol.* 1991 Apr;435:373-93.

Scholz, K.P., and Miller, R.J. (1991). Analysis of adenosine actions on  $Ca^{2+}$  currents and synaptic transmission in cultured rat hippocampal pyramidal neurones. *The Journal of physiology* 435, 373- 393.

Schultz W. (1998) Predictive reward signal of dopamine neurons. *J Neurophysiol.* 80(1):1-27.

Schwarzschild MA, Chen JF and Ascherio A (2002) Caffeinated clues and the promise of adenosine A<sub>2A</sub> antagonists in PD. *Neurology* 58:1154-1160.

Smith Y, Bevan M, Shink E, Bolam J. (1998). Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neurosci* 86:353-387.

Smith Y, Bolam J. (1989). Neurons of the substantia nigra reticulata receive a dense GABA-containing input from the globus pallidus in the rat. *Brain Res* 493:160-167.

Sokoloff P, Giros B, Martres M, Bouthenet M, Schwartz J. (1990). Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D<sub>3</sub>) as a target for neuroleptics. *Nature* 347:146-151.

Song, W.J., Tkatch, T., and Surmeier, D.J. (2000). Adenosine receptor expression and modulation of Ca<sup>2+</sup> channels in rat striatal cholinergic interneurons. *Journal of neurophysiology* 83, 322-332.

Stehle J. H., Rivkees S. A., Lee J. J., Weaver D. R., Deeds J. D. and Reppert S. M. (1992). Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel A<sub>2</sub>-adenosine receptor subtype. *Mol. Endocrinol.* 6:384-393.

Stephenson-Jones M, Samuelsson E, Ericsson J, Robertson B, Grillner S. (2011). Evolutionary conservation of the basal ganglia as a common vertebrate mechanism for action selection. *Curr Biol.* 21:1081-91.

Stiles G. L. (1986). Photoaffinity cross-linked A<sub>1</sub> adenosine receptor-binding subunits. Homologous glycoprotein expression by different tissues. *J. Biol. Chem.* 261:10839-10843.

Stoof JC, Keibarian JW. (1981) Opposing roles for D-1 and D-2 dopamine receptors in efflux of cyclic AMP from rat neostriatum. *Nature.* 294(5839):366-8.

Sunahara RK1, Guan HC, O'Dowd BF, Seeman P, Laurier LG, Ng G, George SR, Torchia J, Van Tol HH, Niznik HB. (1991) Cloning of the gene for a human dopamine D<sub>5</sub> receptor with higher affinity for dopamine than D<sub>1</sub>. *Nature.* 350(6319):614-9.

Svenningsson P, Le Moine C, Fisone G and Fredholm BB (1999) Distribution, biochemistry and function of striatal adenosine A<sub>2A</sub> receptors. *Prog Neurobiol* 59:355-396.

Takakusaki K, Habaguchi T, Ohtinata-Sugimoto J, Saitoh K, Sakamoto T. (2003). Basal ganglia efferents to the brainstem centers controlling postural muscle tone and locomotion: a new concept for understanding motor disorders in basal ganglia dysfunction. *Neurosci* 119:293-308.

Takakusaki K, Oohinata-Sugimoto J, Saitoh K, Habaguchi T. (2004). Role of basal ganglia-brainstem systems in the control of postural muscle tone and locomotion. *Prog Brain Res* 143:231-237.

Tedford H. W., Zamponi G. W. (2006) Direct G protein modulation of Cav2 calcium channels. *Pharmacol Rev.* 58, 837-62.

Thorn JA, Jarvis SM. (1996) Adenosine transporters. *Gen Pharmacol.* 1996 Jun;27(4):613-20.

Tiberi M, Jarvie K, Silvia C, Falardeau P, Gingrich N, Bertrand L, Yang-Feng T, Fremeau Jr. (1991). Cloning, molecular characterization, and chromosomal assignment of a gene encoding a second D1 dopamine receptor subtype: Differential expression pattern in rat brain compared with the D1A receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7491-7495.

Tobler PN, Fiorillo CD, Schultz W. (2005) Adaptive coding of reward value by dopamine neurons. *Science.* 307(5715):1642-5.

Torvinen M, Giné S., Hillion J., Latini S., Canals M., Ciruela F., Bordoni F., Staines W., Pedata F., Agnati L. F., Lluís C., Franco F., Ferré S and Fuxe K. (2002). Interactions among Adenosine Deaminase, Adenosine A1 Receptors and Dopamine D1 Receptors in Stably Cotransfected Fibroblast Cells and Neurons. *Neurosci.* 113(3):709-719.

Vallone D1, Picetti R, Borrelli E. (2000) Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev.* 24(1):125-32.

Van Tol H, Bunzow J, Guan H, Sunahara R, Seeman P, Niznik H, Civelli O. (1991). Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* 350:610-619.

Varani K, Vincenzi F, Tosi A, Gessi S, Casetta I, Granieri G, Fazio P, Leung E, MacLennan S, Granieri E, Borea PA. (2010) A2A adenosine receptor overexpression and functionality, as well as TNF-alpha levels, correlate with motor symptoms in Parkinson's disease. *FASEB J.* 2010 Feb;24(2):587-98.

Vilchis C, Bargas J, Ayala GX, Galvan E, Galarraga E (2000) Ca<sup>2+</sup> channels that activate Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> currents in neostriatal neurons. *Neuroscience* 95:745-752.

Wang G, Dayanithi G, Custer EE, Lemos JR. (2002) Adenosine inhibition via A(1) receptor of N-type Ca(2+) current and peptide release from isolated neurohypophysial terminals of the rat. *J Physiol.* 540:791-802.

Wardas J (2008) Potential role of adenosine A2A receptors in the treatment of schizophrenia. *Front Biosci* 13:4071-4096.

Wetherington JP, Lambert NA. (2002) Differential desensitization of responses mediated by presynaptic and postsynaptic A1 adenosine receptors. *J Neurosci.* 2002 Feb 15;22(4):1248-55.

Wheeler, D.B., Randall, A. and Tsien, R.W. (1994). Roles of N-type and Q-type Ca2+ channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science* 264, 107–111.

Wichmann T, DeLong M. (2003). Functional neuroanatomy of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Adv Neurol* 91:9-18.

Wilson CJ, Groves PM (1980) Fine structure and synaptic connections of the common spiny neuron of the rat neostriatum: a study employing intracellular injection of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 194:599-615.

Wirkner, K., Assmann, H., Köles, L., Gerevich, Z., Franke, H., Nörenberg, W., Boehm, R., Illes, P., (2000). Inhibition by adenosine A2A receptors of NMDA but not AMPA currents in rat neostriatal neurons. *British Journal of Pharmacology* 130, 259–269.

Wong, A.Y., Billups, B., Johnston, J., Evans, R.J., and Forsythe, I.D. (2006). Endogenous activation of adenosine A1 receptors, but not P2X receptors, during high-frequency synaptic transmission at the calyx of Held. *Journal of neurophysiology* 95, 3336-3342.

Woods AS, Lluís C, Franco R. (2007). Adenosine receptor heteromers and their integrative role in striatal function. *ScientificWorldJournal.* 2;7:74-85.

Wu, L.-G. and Saggau, P. (1994). Adenosine inhibits evoked synaptic transmission primarily by reducing presynaptic calcium influx in area CA1 of hippocampus. *Neuron* 12, 1139–1148

Yabuuchi K, Kuroiwa M, Shuto T, Sotogaku N, Snyder GL, Higashi H, Tanaka M, Greengard P, Nishi A. (2006). Role of adenosine A1 receptors in the modulation of dopamine D1 and adenosine A2A receptor signaling in the neostriatum. *Neuroscience.* 141(1):19-25.

Yan Z, Surmeier DJ (1996) Muscarinic (m2/m4) receptors reduce N- and P-type Ca2+ currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a fast, membrane delimited, G-protein pathway. *J Neurosci* 16:2592-2604.



Yan Z., Surmeier D. J. (1996) Muscarinic (m2/m4) receptors reduce N- and P-type Ca<sup>2+</sup> currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a fast, membrane-delimited, G-protein pathway. *J Neurosci* . 2592-604.

Yin H, Knowlton B. (2006). The role of the basal ganglia in habit formation. *Nat Rev Neurosci* 7:464-476.

Zamponi GW, Snutch TP (1998) Modulation of voltage-dependent calcium channels by G proteins. *Curr Opin Neurobiol* 8:351-356.

## 11. ANEXO I

Purinergic Signalling  
 DOI 10.1007/s11302-013-9386-z

ORIGINAL ARTICLE

## Modulation of $\text{Ca}^{2+}$ -currents by sequential and simultaneous activation of adenosine $\text{A}_1$ and $\text{A}_{2A}$ receptors in striatal projection neurons

O. Hernández-González · T. Hernández-Flores ·  
 G. A. Prieto · A. Pérez-Burgos · M. A. Arias-García ·  
 E. Galarraga · J. Bargas

Received: 17 June 2013 / Accepted: 21 August 2013  
 © Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

**Abstract**  $\text{D}_1$ - and  $\text{D}_2$ -types of dopamine receptors are located separately in direct and indirect pathway striatal projection neurons (dSPNs and iSPNs). In comparison, adenosine  $\text{A}_1$ -type receptors are located in both neuron classes, and adenosine  $\text{A}_{2A}$ -type receptors show a preferential expression in iSPNs. Due to their importance for neuronal excitability,  $\text{Ca}^{2+}$ -currents have been used as final effectors to see the function of signaling cascades associated with different G protein-coupled receptors. For example, among many other actions,  $\text{D}_1$ -type receptors increase, while  $\text{D}_2$ -type receptors decrease neuronal excitability by either enhancing or reducing, respectively,  $\text{Ca}_v1$   $\text{Ca}^{2+}$ -currents. These actions occur separately in dSPNs and iSPNs. In the case of purinergic signaling, the actions of  $\text{A}_1$ - and  $\text{A}_{2A}$ -receptors have not been compared observing their actions on  $\text{Ca}^{2+}$ -channels of SPNs as final effectors. Our hypotheses are that modulation of  $\text{Ca}^{2+}$ -currents by  $\text{A}_1$ -receptors occurs in both dSPNs and iSPNs. In contrast, iSPNs would exhibit modulation by both  $\text{A}_1$ - and  $\text{A}_{2A}$ -receptors. We demonstrate that  $\text{A}_1$ -type receptors reduced  $\text{Ca}^{2+}$ -currents in all SPNs tested. However,  $\text{A}_{2A}$ -type receptors enhanced  $\text{Ca}^{2+}$ -currents only in half tested neurons. Intriguingly, to observe the actions of  $\text{A}_{2A}$ -type receptors, occupation of  $\text{A}_1$ -type receptors had to occur first. However,  $\text{A}_1$ -receptors decreased  $\text{Ca}_v2$   $\text{Ca}^{2+}$ -currents, while  $\text{A}_{2A}$ -type receptors enhanced current through  $\text{Ca}_v1$  channels. Because these channels have opposing actions on cell discharge, these

differences explain in part why iSPNs may be more excitable than dSPNs. It is demonstrated that intrinsic voltage-gated currents expressed in SPNs are effectors of purinergic signaling that therefore play a role in excitability.

**Keywords** Adenosine  $\text{A}_1$ -type receptor · Adenosine  $\text{A}_{2A}$ -type receptor · Striatal projection neurons · Excitability · Modulation of  $\text{Ca}^{2+}$ -currents

### Introduction

The neostriatum regulates motor activity, action selection and procedural memory [1]. It receives inputs from the cortex and thalamus and sends processed outputs to other basal ganglia nuclei via striatal projection neurons (SPNs) divided into direct pathway neurons (dSPNs) that facilitate movement execution and indirect pathway neurons (iSPNs) that represses movements [2, 3]. A dynamic balance between dSPNs and iSPNs is posited as essential for motor control [1].

SPNs control their excitability in part by expressing different classes of  $\text{Ca}^{2+}$ -channels modulated by transmitters that activate G protein-coupled receptors (GPCRs).  $\text{Ca}_v1$  channels increase excitability by regulating threshold and neuronal discharge, while  $\text{Ca}_v2$  channels decrease excitability by activating  $\text{K}^+$ -activated currents that regulate inter-spike intervals, firing frequency, and transmitter release [4–6], among other actions. For example, in addition to many other functions [7],  $\text{D}_1$ -receptors increase excitability in dSPNs by enhancing  $\text{Ca}_v1$ -channels mediated current, while  $\text{D}_2$ -receptors decrease excitability in iSPNs by reducing the same current [8, 9].

O. Hernández-González · T. Hernández-Flores · G. A. Prieto ·  
 A. Pérez-Burgos · M. A. Arias-García · E. Galarraga · J. Bargas (✉)  
 División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular,  
 Universidad Nacional Autónoma de México [UNAM], P.O. Box:  
 70-253, Mexico City, México 04510  
 e-mail: j.bargas@ifc.unam.mx

These actions occur separately in different cell classes: dSPNs and iSPNs [10].

In order to compare with other GPCRs, such as dopamine receptors, this work focuses on how adenosine controls  $\text{Ca}^{2+}$ -currents in SPNs via the two adenosine receptors:  $A_1$  and  $A_{2A}$  [11, 12]. Notably,  $A_1$  receptors are expressed in SPNs from both pathways, while  $A_{2A}$  receptors are mainly expressed in iSPNs [12, 13].  $A_1$ -receptors are coupled to  $G_{i/o}$  proteins [12, 14–23], while  $A_{2A}$  receptors are coupled to  $G_{s/olf}$  proteins [11, 12, 24–31]. In many cells, the signaling cascades ignited by these two classes of G proteins have opposed actions [30–34]. Therefore, an implicit hypothesis predicts that the signaling cascades that control  $\text{Ca}^{2+}$ -currents and excitability via  $A_1$ - and  $A_{2A}$ -receptors would have a push-pull kind of effects: One would decrease and the other would increase the activity of many final effectors in cells expressing both receptors [12, 32, 33, 35–37]. However, to our knowledge, the modulatory actions of both adenosine receptors on  $\text{Ca}^{2+}$ -currents, expressed by the same SPNs, have not been described. A main goal of the present work is to see whether this modulation is present, as a necessary step to begin elucidating the combined actions of  $A_1$ - and  $A_{2A}$ -receptors in control and under diverse pathological conditions by using  $\text{Ca}^{2+}$ -channels, as final intrinsic effectors of adenosine signaling. One of many examples of the importance of this signaling is that antagonists of  $A_{2A}$ -receptors are used as coadjuvant therapy for Parkinson's disease. However, in spite of their actions in synaptic transmission, they are unable to stop the decrease in dendritic spines induced by dopamine-depletion, an action attributable to  $\text{Ca}_v1$  channels [34].

## Materials and methods

Studies were conducted in accordance with procedures approved by the Committee of Bioethics and Care of Experimental Animals of The Universidad Nacional Autónoma de México [UNAM], and the National Institutes of Health Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals [NIH Publications No. 8023, revised 1978]. The number of animals used in the experimental samples was the minimal possible to attain statistical significance.

### Acutely dissociated cells

Acutely dissociated neurons from rat brain slices were obtained as described in previous work [6, 38]. Briefly, male Wistar rats were anesthetized and decapitated. Their brains were placed in ice-cold saline (4 °C) containing [in millimolars]: 126 NaCl, 3 KCl, 26  $\text{Na}_2\text{HCO}_3$ , 2  $\text{CaCl}_2$ , 1  $\text{MgCl}_2$ , 11 glucose, 0.2 thiourea, and 0.2 of ascorbic acid [25 °C; pH=7.4 with HCl, 298±5 mOsm/l with glucose; saturated with 95 %  $\text{O}_2$  and 5 %  $\text{CO}_2$ ]. Sagittal brain slices, 300  $\mu\text{m}$  thick, were cut

on a vibratome and placed in the same saline solution at room temperature for 1 h. In case the slices were programmed for current-clamp experiments, they were transferred to a recording chamber. If they were used in voltage-clamp experiments, we obtained dissociated cells from the dorsal neostriatum by enzymatic digestion—1 mg/ml of pronase E type XIV [Sigma] at 34 °C in a 10 mM HEPES saline solution for about 20 min. Then, the slices were transferred to a low calcium (0.4 mM  $\text{CaCl}_2$ ) saline solution to be mechanically dissociated using fire polished Pasteur pipettes. The cell suspension (2 ml) was plated into a Petri dish mounted on the stage of an inverted microscope. Neurons adhered to the bottom of the dish within 10–15 min. The dish contained 1 ml of the recording saline (in millimolars)—0.001 tetrodotoxin (TTX), 130 NaCl, 3 KCl, 5  $\text{BaCl}_2$ , 2  $\text{MgCl}_2$ , 10 HEPES, and 10 glucose (pH=7.4 with NaOH; 298±5 mOsm/l with glucose).

### Voltage clamp recordings of calcium currents

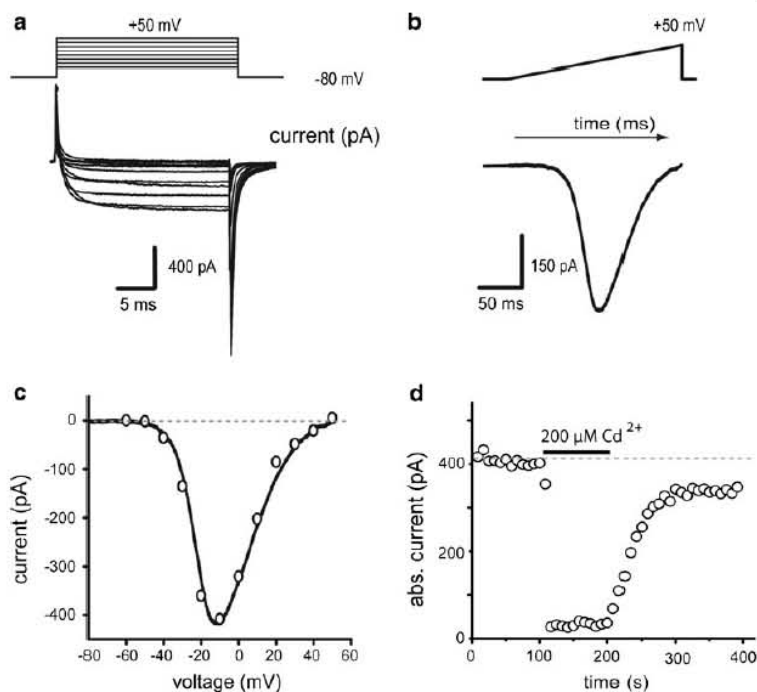
Voltage-clamp recordings were performed on striatal neurons of 10–12  $\mu\text{m}$  soma diameter and whole-cell capacitance of 6–7 pF (putative SPNs). Larger neurons are known to correspond to interneurons [38]. Patch pipettes of borosilicate glass (WPI, Sarasota, FL) were pulled in a Flaming-Brown puller [Sutter Instrument Corp. Novato, CA]. The internal saline contained (in millimolars)—140N-methyl-D-glucamine, 40 HEPES, 10 EGTA, 4  $\text{MgCl}_2$ , 2 ATP, 0.4 GTP, and 0.1 leupeptin (pH=7.2 with  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; 280±5 mOsm/l).

Whole-cell recordings used electrodes with resistance of 3–6  $\text{M}\Omega$  in the bath. Liquid junction potentials (<5 mV) were corrected. Recordings were obtained with an Axopatch 200B patch-clamp amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) and controlled and monitored with pClamp (version 8.2) and a 125 kHz DMA interface (Axon Ins.). The series resistance (<10 $\text{M}\Omega$ ) was compensated (70–80 %) and monitored.

We recorded currents passing through calcium channels using  $\text{Ba}^{2+}$  as charge carrier.  $\text{Ba}^{2+}$  is a potent  $\text{K}^+$  channel blocker.  $\text{Na}^+$  channels were blocked with 1  $\mu\text{M}$  TTX. In addition, intracellular potassium was replaced by 140 mM N-methyl-D-glucamine. Current-voltage relationships (I-V plots) were generated before and during drug application. Figure 1a shows a family of  $\text{Ba}^{2+}$ -currents evoked with 20 ms depolarizing voltage commands from -80 to 50 mV in 10 mV steps. Figure 1b shows a  $\text{Ba}^{2+}$ -current evoked with a ramp voltage command from -80 to 50 mV (0.7 mV/ms) in the same cell. The measured current in steady state responses to step voltage commands [empty circles] and ramp voltage commands [continuous line] are plotted against voltage values in Fig. 1c. Resulting current-voltage relationships (I-V plots) coincide [4–6, 38–42], suggesting acceptable space-clamp control. For clarity, results mostly show I-V plots built from currents evoked with ramp commands. Note that this coincidence



**Fig. 1** Whole-cell  $\text{Ca}^{2+}$ -currents in acutely dissociated neostriatal neurons. **a** Inward currents elicited by steps of depolarizing voltage commands. **b** Inward current elicited in the same neuron by a ramp command. **c** Current-voltage relationships (I-V plots) taken from data in **a** and **b**. Note close superimposition. **d** Time course of absolute current amplitude during application of  $200 \mu\text{M Cd}^{2+}$



implies that amplitude of peak  $\text{Ba}^{2+}$ -current obtained with a ramp command coincides with the minimum of the I-V plot (between  $-20$  and  $0$  mV in all cases). Currents isolated in this way are completely and reversibly blocked by  $200 \mu\text{M Cd}^{2+}$  ( $93 \pm 1\%$ ;  $n=6$ ;  $***P<0.001$ , Fig. 1d), suggesting that they flow through  $\text{Ca}^{2+}$ -channels, and so, in the text they are named as  $\text{Ca}^{2+}$ -currents.

#### Current clamp recordings of SPNs

Current clamp recordings were performed with the patch clamp technique in the whole cell configuration in both putative dSPNs and iSPNs. The slices were visualized at  $40\times$  using infrared differential interference contrast (IR-DIC) microscopy with an upright microscope and a digital camera. For current-clamp recordings micropipettes with  $2\text{--}5 \text{ M}\Omega$  D.C. resistance and filled with internal saline containing (in millimolars)— $120 \text{ KMeSO}_4$ ,  $10 \text{ NaCl}$ ,  $10 \text{ EGTA/KOH}$ ,  $10 \text{ Hepes}$ ,  $1 \text{ CaCl}_2$ ,  $0.2 \text{ Na}_2\text{ATP}$ ,  $0.2 \text{ Na}_3\text{GTP}$ , and  $0.1\%$  biocytin (pH 7.3;  $285 \text{ mOsm/l}$ ) were used. Recordings were carried out with Axoclamp 2A/2B (Axon Instruments, Foster City, CA). The data were acquired with acquisition software made in the laboratory using the LabView environment (National Instruments, Austin TX). Experimental drugs were stored in stock

solutions to be dissolved in their final concentrations into the superfusion saline—CCPA ( $100 \text{ nM}$ ) and CGS ( $1 \mu\text{M}$ ).

#### Drugs

Drugs were applied with a gravity-fed system that positioned a glass capillary tube  $100 \mu\text{m}$  from the recording cell in the direction of superfusion flow. Solution changes used a microvalve system (Lee; Essex, CT, USA) allowing reversibly applications [41]. Substances used were:  $\omega$ -conotoxin GVIA ( $\omega$ -CgTx-GVIA),  $\omega$ -agatoxin TK ( $\omega$ -AgTx), tetrodotoxin (TTX) (from Alomone Labs; Jerusalem, Israel); nicardipine, adenosine (Sigma-Aldrich-RBI, St. Louis, MO). The  $\text{A}_1$ -type receptor agonist—2-chloro- $\text{N}^6$ -cyclopentyladenosine (CCPA), the  $\text{A}_{2\text{A}}$ -type receptor agonist: 4-(2-((6-amino-9-(*N*-ethyl- $\beta$ -D-ribofuranuron-amidosyl)-9H-purin-2-yl)amino)ethyl)benzene propanoic acid hydrochloride (CGS 21680), the  $\text{A}_{2\text{A}}$ -type receptor antagonist—2-(2-furanyl)-7-(2-phenylethyl)-7H-pyrazolo(4,3-e)(1,2,4)triazolo(1,5-c)pyrimidin-5-amine (SCH 58261) and the  $\text{A}_1$ -type receptor antagonist—8-cyclopentyl-1,3-dimethylxanthine (CPT; Tocris Cookson, Ellisville, MO). Substances were dissolved in water to get stock solutions added to the superfusate to give the final concentrations. CGS 21680 was prepared in dimethylsulfoxide (DMSO,  $1\%$ ) and

nicardipine was prepared in HCl (1 %); control saline also contained DMSO or HCl (0.1 %) at the same concentrations in these cases.

#### Data analysis

We report mean $\pm$ SEM of peak Ba<sup>2+</sup>-current changes in percentage (minimum of I-V plots, see above). When it is relevant we report medians and the 25–75 percentile range of absolute current values, since as Tukey box plots show, rarely, distribution of samples followed normality. To measure excitability, we compared firing frequency in Hertz. Statistical significance was found with free-distribution statistical tests with absolute current values or frequencies: Wilcoxon's *T* test, Friedman test, or Kruskal–Wallis test with post hoc Dunn's tests. Statistical significance was considered at *P*<0.05.

#### Results

Time course in Fig. 2a shows that administration of an adenosine A<sub>2A</sub>-type receptor agonist, CGS 21680 (CGS), to the bath saline has no action by itself in Ca<sup>2+</sup>-currents amplitude. The same result was obtained using concentrations ranging from 5 nM to 10  $\mu$ M, although, in some occasions, micromolar concentrations may decrease current amplitude. Figure 2b illustrates representative I-V plots taken at numbered times from A. Box plots in Fig. 2c show that there is no significant differences between Ca<sup>2+</sup>-currents maximal amplitude obtained with ramp commands (as in Fig. 1: minima of the I-V plots), with or without the A<sub>2A</sub>-agonist in all neurons tested (*n*=6).

Adenosine actions are biphasic and concentration-dependent

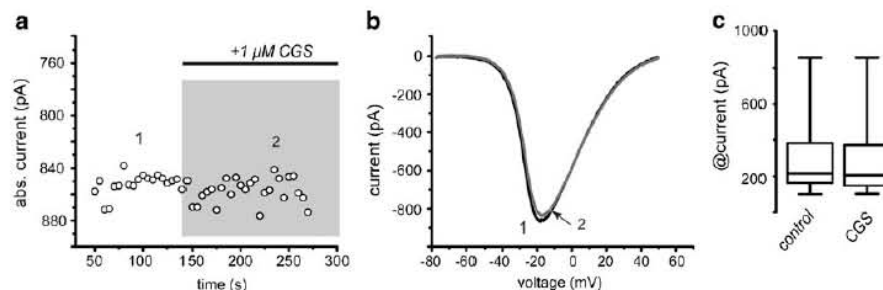
Time course in Fig. 3a shows that adenosine, when administered sequentially, at “low” (100 nM) and “high” (10  $\mu$ M)

concentrations, has a push-pull type of action—100 nM adenosine decreased absolute Ca<sup>2+</sup>-current amplitude by 29 $\pm$ 3 % (*n*=13; \*\*\**P*<0.0001), while 10  $\mu$ M adenosine increased and partially reversed the decrease induced by low concentrations: It partially “recovers”, the Ca<sup>2+</sup>-current by 21 $\pm$ 3 %. However, this latter action was only observed in 54 % of neurons tested (“responders”; *n*=7/13; \*\*\**P*<0.0001; Fig. 3a). Neurons that did not exhibit an increase in current with 10  $\mu$ M adenosine (“non responders”) but were able to manifest a decrease during low adenosine concentrations were considered as not capable to manifest the enhancing response and were separated as a group, because it is well known that only half of SPNs (iSPNs) express A<sub>2A</sub>-receptors [12].

The action of low adenosine concentrations was reversible, present in all SPNs tested, and blocked by the A<sub>1</sub>-receptor antagonist 100 nM CPT (not shown, but see below), suggesting that it can be attributed to the activation of A<sub>1</sub>-receptors. Therefore, as expected for a GPCR associated with G<sub>i/o</sub> protein, activation of A<sub>1</sub>-receptors decreased Ca<sup>2+</sup>-currents amplitude [12, 14–23], and in agreement with its known location, the action was observed in all SPNs tested. Representative I-V plots of currents taken at different moments during the time course are depicted in Fig. 3b (numbered in the time course, Fig. 3a).

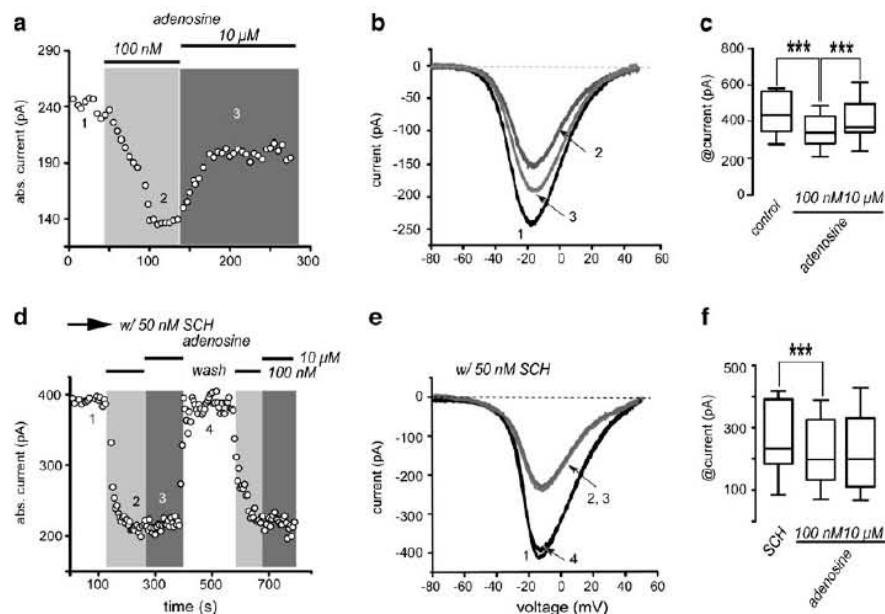
Box-plots in Fig. 3c summarize the results from a sample of experiments: median and 25–75 percentile range in control (*n*=13) was 408 (307–557)pA, reduction with 100 nM adenosine (*n*=13) was to 298 (237–400)pA and reversal with 10  $\mu$ M adenosine (*n*=7) was to 331 (301–478)pA. All changes were significant (\*\*\**P*<0.0001).

To demonstrate that high adenosine concentrations were acting on A<sub>2A</sub>-type receptors, we tested 10  $\mu$ M adenosine in the presence of the A<sub>2A</sub>-type receptor antagonist SCH 58261 (50 nM SCH; Fig. 3d). Note that, in the presence of SCH, the recovery of current amplitude by high adenosine concentrations (10  $\mu$ M) was not seen in any neuron (Fig. 3d), suggesting specific actions. Specificity was further supported



**Fig. 2** A selective A<sub>2A</sub>-type receptor agonist had no actions on Ca<sup>2+</sup>-current by itself. **a** The time course shows the application of an A<sub>2A</sub>-type receptor agonist: 1  $\mu$ M CGS into the bath saline (horizontal bar). There is no change in current amplitude. **b** representative I-V plots taken at

numbered times from the time course in **a**. **c** Box Tukey plots in Fig. 2c show that there is no significant differences between Ca<sup>2+</sup>-currents amplitude with or without the CGS in all neurons tested (*n*=6)



**Fig. 3** Adenosine actions are biphasic and concentration-dependent. **a** Addition of low adenosine concentrations (100 nM) to the bath saline decreases absolute current amplitude, whereas application of higher adenosine concentrations (10  $\mu$ M) partially reversed the current decrease produced by lower adenosine concentrations. **b** Representative I-V plots taken from the time course in **a** as indicated by the numbers. **c** Box plots summarizing a sample of experiments from neurons during both

adenosine concentrations ( $n=13$  for left and middle boxes,  $n=7$  for right box). **d** The time course shows that reduction in current produced by low adenosine concentrations was not blocked by SCH 58261 while current enhancement mediated by micromolar adenosine was not present in any recorded cell when SCH 58261 was present. **e** Representative I-V plots taken from the time course in **d** as indicated by numbers. **f** Box plots summarize a sample of similar experiments ( $n=13$ )

by the fact that low adenosine concentrations (100 nM) still reduced  $\text{Ca}^{2+}$ -currents (21  $\pm$  4 %;  $n=13$ ;  $***P<0.0001$ ) in the presence of the  $\text{A}_{2\text{A}}$ -receptor antagonist in all neurons tested. Representative I-V plots of these currents are depicted in Fig. 3e. Box plots in Fig. 3f summarize sample results. Median and 25–75 percentile range in control were 227 (176–391)pA, reduction with 100 nM adenosine was to 191 (124–322)pA. Reversal with 10  $\mu$ M adenosine was not seen in any cell when SCH 58261 was present: 192 (101–327)pA. In CGS, only changes due to  $\text{A}_1$ -receptor activation were significant ( $***P<0.0001$ ).

All SPNs exhibited a decrease in current after nanomolar adenosine, but only one half of SPNs exhibited the subsequent enhancement of the current after micromolar adenosine. A parsimonious hypothesis would be that this biphasic action in one half of neurons should be due to the activation of two different adenosine receptors. Therefore, we hypothesized that the enhancing action should be due to the activation of  $\text{A}_{2\text{A}}$ -receptors ( $\text{A}_{2\text{A}}$ -receptors activate PKA which is necessary for  $\text{D}_1$ -receptors to enhance  $\text{Ca}^{2+}$ -current) see [8].

To further support that the biphasic action of adenosine found in about one half of tested cells was due to the activation

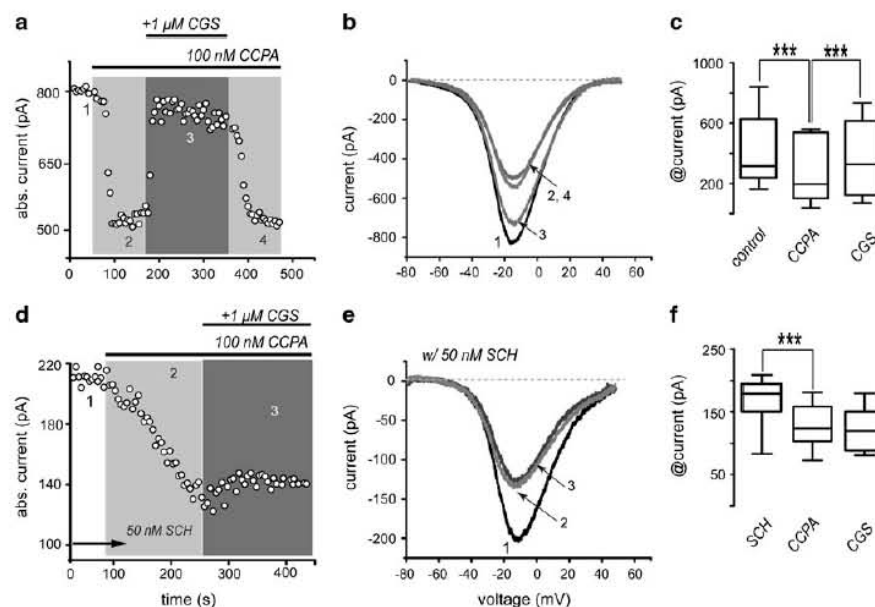
of different receptors, we tested selective agonists for both receptors in sequence.

Sequential activation of  $\text{A}_1$ - and  $\text{A}_{2\text{A}}$ -type receptors reduces and enhances  $\text{Ca}^{2+}$ -currents, respectively

Application of 100 nM CCPA, a selective agonist of  $\text{A}_1$ -receptors, decreased whole-cell  $\text{Ca}^{2+}$ -current in all SPNs tested ( $n=13$ ). Subsequent addition of 1  $\mu$ M CGS 21680, a selective agonist of  $\text{A}_{2\text{A}}$ -receptors, had an enhancing current effect in about half of the cells (“responders”) but did not have any action in the other half (“non-responders”; Fig. 4a, b). But all cells showed the decreasing action by the  $\text{A}_1$ -agonist. Interestingly, because  $\text{A}_{2\text{A}}$ -agonists had no significant action when applied alone (Fig. 2), it appeared as though  $\text{A}_1$ -receptors occupation had to precede the activation of  $\text{A}_{2\text{A}}$ -receptors to observe their enhancing actions on  $\text{Ca}^{2+}$ -currents [36, 37, 43–46]. The reason why  $\text{A}_1$ -receptors have to be activated first, in order to see the actions of  $\text{A}_{2\text{A}}$ -receptors, is under current research. Perhaps, many other receptors and signaling cascades also fulfill this function [33].

In summary, the administration of  $\text{A}_1$ - and  $\text{A}_{2\text{A}}$ -receptor agonists applied in sequence (Fig. 4a, b) mimicked the





**Fig. 4** Sequential activation of  $A_1$ - and  $A_{2A}$ -type receptors with selective agonists reduces and enhances  $Ca^{2+}$ -current, respectively. **a** Time course of current amplitude showing that CCPA (100 nM) decreases current amplitude (1, 2). Subsequent application of 1  $\mu$ M CGS 21680 (2, 3) almost completely reverses the reduction induced by CCPA in about half the neurons. **b** Representative I-V plots taken from the time course in **a** as indicated by the numbers. **c** Box plots summarize results from a sample of

neurons with responses described in **a** and **b** ( $n=13$  in left and middle boxes and  $n=7$  in the right box). **d** Time course similar to that depicted in **a** but in the presence of 50 nM of the  $A_{2A}$ -receptor antagonist SCH 58261. In these conditions, the action of CGS 21680 could not be observed in any neuron. **e** Representative I-V plots taken from the time course in **d** as indicated by the numbers. **f** Box plots summarize the experimental sample ( $n=8$ )

biphasic actions described for adenosine at low and high concentrations, and thus, support the concept that such biphasic action is due to the activation of different adenosine receptors. CCPA decreased  $Ca^{2+}$ -current in all striatal neurons tested (Fig. 4a1, 2) by  $25 \pm 4\%$  ( $n=13$ ;  $***P < 0.0001$ ), and the subsequent application of the  $A_{2A}$ -receptor agonist, CGS 21680, partially restored current amplitude in 54 % of the neurons tested (Fig. 4a-c;  $n=7/13$ ). Action in only about half the neurons was expected because only iSPNs express  $A_{2A}$ -receptors [12], supporting the hypothesis that iSPNs express both receptors. Current increase induced by CGS 21680 was  $23 \pm 4\%$  ( $n=7$ ;  $***P < 0.0001$ ). Representative I-V plots of these currents are depicted in Fig. 4b (times of recordings are numbered during the time course in Fig. 4a). CGS 21680 actions were reversible (Fig. 4a, b). Tukey box distributions in Fig. 4c summarize the results from a sample of experiments: median and 25–75 percentile range in control was 315 (239–628)pA, reduction with CCPA was to 197 (103–539)pA and reversal with CGS 21680 was to 328 (124–615)pA. All changes were significant ( $***P < 0.0001$ ).

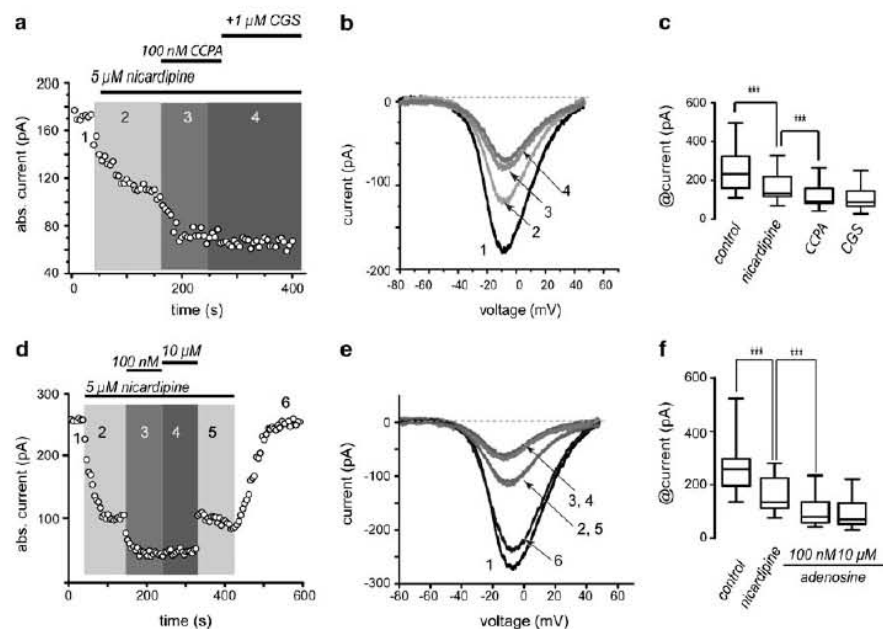
To test whether enhancement of  $Ca^{2+}$ -current amplitude by CGS 21680 was specific, we performed experiments in the

presence of SCH 58261 (50 nM), the  $A_{2A}$ -receptors antagonist. SCH 58261 did not block the repressing action of  $A_1$ -receptors, but in its presence, no neuron exhibited the  $A_{2A}$ -receptors enhancing action (Fig. 4d). Representative I-V plots as indicated by numbers are shown in Fig. 4e. Box plots summarize results in an experimental sample: Only the action of CCPA is significant in the presence of SCH 58261 (Fig. 4d–f): a  $22 \pm 3\%$  current reduction ( $n=8$ ,  $***P < 0.0001$ ).

We conclude that biphasic actions of adenosine are due to the activation of two different receptors,  $A_1$  and  $A_{2A}$ .  $A_{2A}$ -type receptors are only present in half the neurons: most probably iSPNs.

#### $A_{2A}$ -receptors activation enhance $Ca_v1$ channels current

The following experiments depict a mechanism for the biphasic adenosine actions in the sense of finding out which  $Ca^{2+}$ -currents are implicated. Figure 5a shows that 5  $\mu$ M nicardipine, a  $Ca_v1$ -channels antagonist, decreased current amplitude; however, it did not impede the action of 100 nM CCPA that decreased current amplitude even more. However, in the presence of nicardipine, subsequent application of 1  $\mu$ M CGS



**Fig. 5**  $A_{2A}$  but not  $A_1$  receptor actions are blocked by dihydropyridines. **a** Time course illustrates the sequential reduction with CCPA and the reversal of current amplitude with CGS 21680. The action of the  $A_{2A}$ -receptor agonist was blocked by 5  $\mu$ M nicardipine. **b** Representative I-V plots taken from the time course in **a** as indicated by the numbers. **c** Box plots summarizing a

sample of similar experiments ( $n=10$  for control;  $n=6$  for nicardipine, CCPA and CGS). **d** Time course shows that 5  $\mu$ M nicardipine administered first occludes the action of high but not of low concentrations of adenosine. **e** Representative I-V plots taken from the time course in **d** as indicated by the numbers. **f** Box plots summarizing a sample of similar experiments ( $n=12$ )

21680 did not produce current enhancement in any cell tested. Representative I-V plots (numbered in the time course; Fig. 5b) and summary box plots (Fig. 5c) show that CCPA current reduction was  $39 \pm 10$  % ( $n=10$ ;  $***P < 0.0001$ ) and CGS recovery was  $32 \pm 8$  % ( $n=6$ ;  $***P < 0.0001$ ). Nicardipine blocked the recovery produced by CGS 21680 significantly ( $41 \pm 4$  %;  $n=6$ ;  $***P < 0.0001$ ). Control had median and percentile 25–75 range of 197 (180–243)pA; +CCPA: 130 (77–183)pA; +CGS 21680: 222 (152–238)pA; +nicardipine: 92 (81–175)pA. All changes were significant ( $***P < 0.0001$ ).

Similar results were obtained with the endogenous agonist (Fig. 5d–f): Adenosine (100 nM) decreased current amplitude by  $20 \pm 2$  %, and high concentrations (10  $\mu$ M) had no effects in any cell tested if 5  $\mu$ M nicardipine were present in the bath saline, suggesting that  $Ca_v1$  currents are the target of  $A_{2A}$ -receptor modulation ( $n=12$ ;  $***P < 0.0001$ ).

Activation of  $A_1$ -receptors mainly reduce  $Ca_v2.2$  channels current

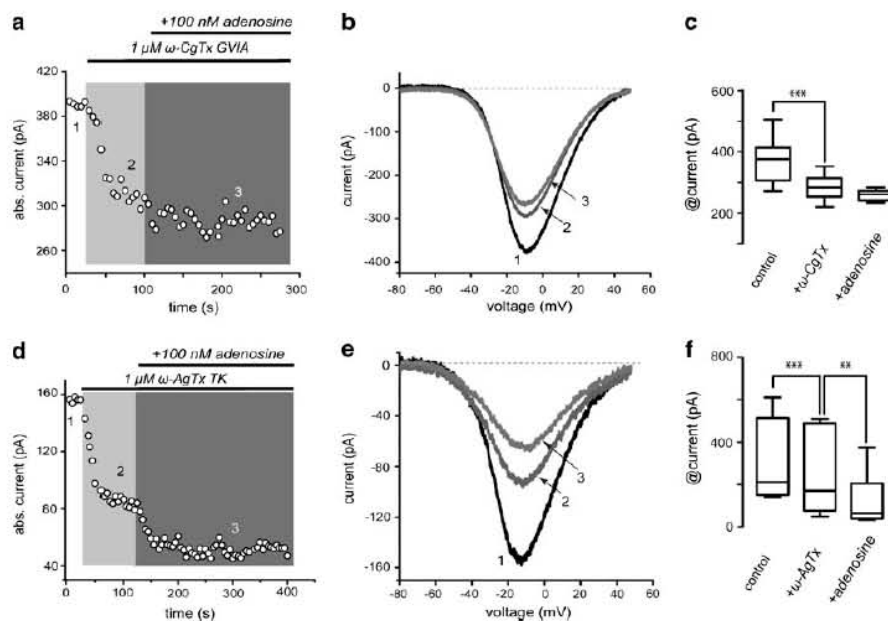
Figure 6a–c illustrates that 1  $\mu$ M  $\omega$ -CgTx GVIA reduces  $Ca^{2+}$  current in SPNs confirming the presence of  $Ca_v2.2$  (N) calcium current [40, 41]. Once  $Ca_v2.2$  current was blocked, low

adenosine concentrations (100 nM) could no longer reduce  $Ca^{2+}$ -current further in any cell tested, suggesting that main current component targeted by  $A_1$ -receptors is  $Ca_v2.2$ . Current reduction by  $\omega$ -CgTx was  $20 \pm 3$  % ( $n=9$ ,  $***P < 0.0001$ ). In contrast, 1  $\mu$ M  $\omega$ -AgTx could not occlude the actions of 100 nM adenosine (Fig. 6d–f;  $n=6$ ).

Box plots in Fig. 6c and f summarize sample results of  $\omega$ -CgTx GVIA and  $\omega$ -AgTx, respectively; median and 25–75 percentile range in Fig. 6c control was 383 (311–422)pA, reduction with 1  $\mu$ M  $\omega$ -CgTx GVIA was to 287 (255–319) pA and with 100 nM adenosine was to 263 (241–274)pA ( $***P < 0.0001$ ). When control was 158 (151–275)pA (Fig. 6f), reduction with 1  $\mu$ M  $\omega$ -AgTx was to 89 (53–179) pA and addition of 100 nM adenosine reduced the current even more to 64 (41–148)pA. All changes were significant ( $***P < 0.0001$ ;  $**P < 0.025$ ).

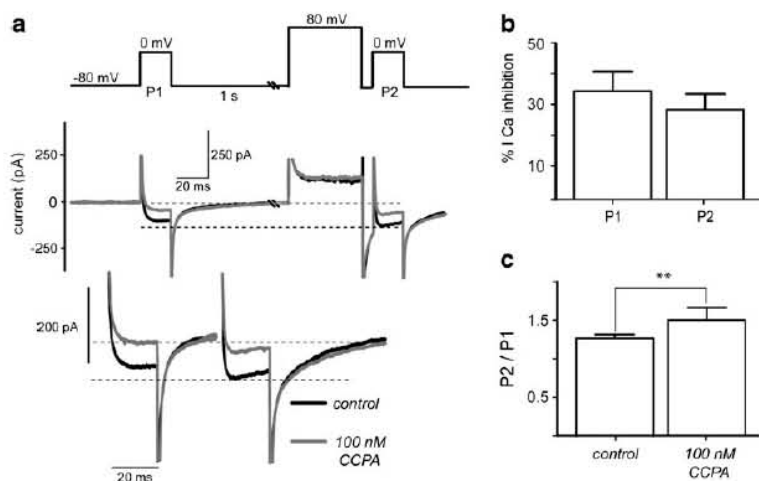
To determine whether  $A_1$ -receptors modulation was voltage-dependent or independent [47], we used a standard double pulse protocol (Fig. 7). Two test voltage commands to zero millivolts evoked  $Ca^{2+}$ -current before (P1) and after an 80 mV pre-pulse (P2) in the absence (black trace) and in the presence (gray trace) of CCPA. As expected, an increase in amplitude and a change in kinetics of control current were





**Fig. 6** Activation of adenosine  $A_1$ -receptor mostly reduces current through  $Ca_v2.2$  (N) channels. **a** Time course illustrates that  $1 \mu\text{M}$   $\omega$ -conotoxin GVIA almost completely occluded the action of  $100 \text{ nM}$  adenosine. **b** Representative I-V plots taken from the time course in **a** as indicated by the numbers. **c** Box plots summarizing a sample of similar

experiments ( $n=9$ ). **d** Time course illustrates that  $1 \mu\text{M}$   $\omega$ -agatoxin IVA did not occlude the action of  $100 \text{ nM}$  adenosine. **e** Representative I-V plots taken from the time course in **a** as indicated by the numbers. **f** Box plots summarizing a sample of similar experiments ( $n=6$ )



**Fig. 7** Most adenosine  $A_1$ -receptors modulation is not voltage-dependent. **a** *Top*: standard double pulse protocol. *Middle*: Evoked currents before (black trace) and after (gray trace) CCPA was added to the bath saline. *Bottom*: enhanced traces evoked with zero millivolts commands before (P1) and after the  $80 \text{ mV}$  pre-pulse (P2). Current increases in amplitude and changes its kinetics during P2 suggesting constitutive G-

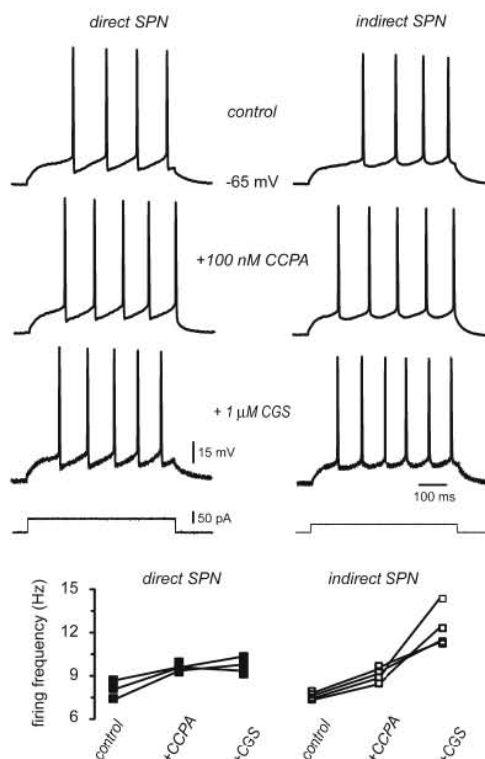
protein action. **b** However, percent amplitude modulation amplitude before and after the  $80 \text{ mV}$  pre-pulse was non-significantly different ( $n=10$ ). **c** Ratio of second (P2) to first response (P1) was slightly different, suggesting that most  $A_1$ -receptor modulation is mainly non-voltage-dependent

observed in the current evoked after the 80 mV depolarization (compare black traces before and after the pre-pulse). This is due to some constitutive G protein activity on the channels which is interrupted by the depolarization (see dashed lines for comparison). In case the predominant action of  $A_1$ -receptors occurs through G proteins acting on the channel, the difference between the currents evoked before and after the pre-pulse should increase in the presence of the agonist CCPA (gray traces). This was not the case; facilitation ratio was  $1.2 \pm 0.05$  in control, suggesting constitutive G protein action, while in the presence of CCPA it was  $1.5 \pm 0.16$ , suggesting that a very small part of the modulation was voltage-dependent ( $n=10$ ;  $P<0.1$ ). During P1, percent amplitude modulation of the current was  $35 \pm 6\%$  while it was  $28 \pm 5\%$  for current evoked by P2 ( $n=10$ ; NS), suggesting that in the present conditions, most  $A_1$ -receptor modulation of the current is not voltage-dependent in SPNs.

In summary, both receptors,  $A_1$  and  $A_{2A}$ , appeared to act via their intracellular signaling cascades and not via a membrane delimited, voltage-dependent mechanism.  $A_{2A}$ -receptors only acted in half the cells (putative iSPNs).  $A_1$ -receptors activation decreased current through  $Ca_v2.2$  channels while  $A_{2A}$ -receptors acted increasing current through  $Ca_v1$  channels. In the soma of SPNs, it is known that  $Ca_v2$  channels are the source of  $Ca^{2+}$  that activates  $Ca^{2+}$ -dependent  $K^+$ -currents that make up the after hyperpolarizing potential (AHP) and thus the interspike intervals (ISIs) [4]. Therefore, suppressing this  $Ca^{2+}$ -source would reduce ISIs and make firing frequency to increase [5]. Figure 8 shows that this inference was correct:  $A_1$ -receptors increased the number of action potentials fired to the same stimulus in all SPNs tested ( $n=7$ ;  $P<0.02$ ). In addition, enhancing  $Ca^{2+}$  current through  $Ca_v1$  channels would increase the number of action potentials fired to the same stimulus since these channels enhance the depolarization induced by the intracellular current step [5]. That is, in neurons with both  $A_1$  and  $A_{2A}$  receptors, the actions of these receptors would be synergistic for excitability given their action on the different  $Ca^{2+}$  currents [6, 8, 9, 38, 40, 42, 48]. This inference was also correct, since in about half of the neurons tested (Fig. 8;  $n=4/7$ ) addition of CGS in the presence of CCPA increased, even more, the number of action potentials fired ( $P<0.05$ ). Because only iSPNs are described to express both  $A_1$  and  $A_{2A}$  receptors, we assumed that it is in these neurons where adenosine exerts its full facilitating actions.

## Discussion

Two main sources of adenosine have been proposed [49, 50]: one caused by the release done by nucleoside transporters after ATP dephosphorylation, the other produced by ectonucleotidases following high neuronal activity. Basal extracellular levels are ca. 40–120 nM [50–55], while micromolar concentrations are



**Fig. 8**  $A_1$  and  $A_{2A}$  receptors have synergistic effects on excitability. **Left and right columns** illustrate the firing of a putative dSPN and an iSPN, respectively, under a stimulus strength that allowed the firing of the same number of action potentials in the control (step current at the bottom). From top to bottom, these responses were subjected to different conditions without changing the stimulus strength: First, addition of CCPA (100 nM) an agonist of  $A_1$ -receptors increased the number of spikes fired in both neurons. Second, addition of CGS 21680 (1  $\mu$ M) an agonists of  $A_{2A}$ -receptors, further increased the number of spikes fired in iSPNs but not in dSPNs. **Graph at the bottom** shows the firing behavior of  $n=7$  neurons. All neurons responded to CCPA, but only four out of seven neurons responded also to CGS

reached during more intense neuronal discharge [52, 56–58]. Low [basal] adenosine concentrations stimulate  $A_1$ -receptors [46, 59, 60], while high concentrations activate  $A_{2A}$ -receptors [37, 45, 46, 60–62]. Taken together, these facts explain why the results of the sequential activation of  $A_1$ -receptors on  $A_{2A}$ -receptors activation was easily observed in dissociated cells taking  $Ca^{2+}$ -currents as effectors (reporters). However, the reason why  $A_1$ -receptors need to be occupied to observe the action of  $A_{2A}$ -receptors actions, although has been noted before [36, 37, 46], is in need of further investigation. In fact, other receptors, e.g., dopamine  $D_2$ -receptors, may also fulfill that role [33, 63, 64].

Adenosine receptors modulate  $\text{Ca}^{2+}$ -currents as other G protein-coupled receptors

Adenosine signaling pathways are well known [11–22];  $A_1$ - and  $A_{2A}$ -receptors have been proposed to have opposite roles by activating  $G_{i/o}$  and  $G_{s/olf}$  proteins, respectively [20–28, 46, 65, 66], similarly to dopamine  $D_1$ - and  $D_2$ -receptors [10] and other G protein-coupled receptors. However, while opposing dopamine receptors are located in different cell classes, different adenosine receptors are located in the same cell class: iSPNs. This fact may confer special excitable functions to iSPNs. Thus, a main goal of the present work was to disclose the source of a possible difference in the excitability of iSPNs due to purinergic mechanisms.

To see  $\text{Ca}^{2+}$ -channels as final effectors to observe GPCRs action down their signaling cascades has a long tradition. A main reason is, precisely, the relation of these channels with neuronal excitability and transmitter release [5, 21, 23, 33, 40, 41, 46, 48, 67]. SPNs express several classes of  $\text{Ca}_v1$  and  $\text{Ca}_v2$  channels [5, 6, 8, 9, 38, 40, 42, 48]. For example,  $\text{Ca}_v1$  current enhances excitability by decreasing firing threshold and enhancing neuronal output range. Current through  $\text{Ca}_v1$  channels amplifies the stimulus. In contrast, current through  $\text{Ca}_v2$  channels have opposed actions; they decrease excitability by inducing the activation of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$ -currents. These currents are in charge of the after hyperpolarizing potentials and interspike intervals that low firing frequency or control the amplitude of synaptic events [5, 33]. Adenosine signaling on  $\text{Ca}^{2+}$ -currents has been documented in other cell classes [15–21]. Accordingly, we wanted to see whether opposing functions of these effectors,  $\text{Ca}^{2+}$ -channels, may parallel expected opposing actions in signaling mechanisms.

As an antecedent,  $A_1$ -type receptors activation decreases glutamate release while  $A_{2A}$ -receptors increase this release [46]. But, to our knowledge, there was no reported evidence that a similar case is present in the  $\text{Ca}^{2+}$ -currents of the same cell, iSPNs, expressing  $A_1$ - and  $A_{2A}$ -type receptors [12].

Here, we show that  $A_1$ -receptors activation reduces  $\text{Ca}_v2.2$  currents in all SPNs tested due to a mechanism that is mostly non-voltage-dependent [6, 16–20, 68–75]. This action would decrease AHPs and thus increase firing frequency [5] in SPNs; that is, it would favor excitation.  $A_1$ -receptors could be activated either with a specific agonist [CCPA] or by low concentrations of adenosine. In addition, in half of SPNs tested,  $A_{2A}$ -receptors enhanced  $\text{Ca}_v1$  currents most probably through a phosphorylation mechanism [12, 26–28, 76]. Phosphorylation of  $\text{Ca}_v1$  channels by  $A_{2A}$ -receptors activation has been reported in conditions of high adenosine release [77]. This action would lower firing threshold and favor evoked depolarization, also increasing the number of action potentials fired. That is, opposing signaling cascades in the same cell, which induce opposing actions on  $\text{Ca}^{2+}$ -currents, may “paradoxically” lead to a synergistic effect on excitability in iSPNs.

This hypothesis was tested with current-clamp experiments and was confirmed.

To conclude, combined actions of  $A_1$  and  $A_{2A}$  receptors on half of SPNs tested, most probably iSPNs, induces and enhancement of excitability larger than that produced by the sole activation of  $A_1$  receptors.

Only iSPNs express  $A_{2A}$ -receptors [12].  $A_{2A}$ -receptors could be activated either with a specific agonist (CGS 21680) or by increasing the concentration of the endogenous transmitter [46, 60–62, 66]. In our hands, both actions were blocked by the highly selective  $A_{2A}$ -receptor antagonist, SCH 58261, suggesting specificity. In other words, the sequential activation of receptors with opposing signaling,  $A_1$  and  $A_{2A}$ , decrease and increase, respectively,  $\text{Ca}^{2+}$ -currents with opposing actions on cell excitability. These actions in turn lead to an increase in excitability.

However, note that these actions were described in the somatic region, where fast sodium-dependent action potentials are generated. Another similar story has been partially built in dendritic spines where synaptic inputs arrive [33]. But further work is needed to link the known adenosine signaling cascades with excitability. The extrapolation of the present results with known channels actions [5, 41, 42] can lead to useful explanatory hypothesis: Excitability of iSPNs is more enhanced than that of dSPNs during models of Parkinson's disease (PD). This phenomenon may in part be due to intrinsic mechanisms originated in the same iSPNs. In addition, extrinsic mechanisms may alter cortical inputs, since synaptic activity is increased [34]. Interestingly, although this increase in synaptic activity can be regulated with  $A_{2A}$ -receptor antagonists, this regulation is not accompanied with spines recovery, thus disrupting a homeostatic mechanism [34]. Previous work has shown that spines stability depends in part on  $\text{Ca}_v1$  channels activity [76] that we demonstrate here are also enhanced by  $A_{2A}$  receptors, making this interplay difficult to assess. In any case, the present results adds to a growing list of evidences that supports the blockade of  $A_{2A}$ -receptors as an adjunct therapy for PD by balancing basal ganglia pathways.

Finally, we stress the notion that  $A_{2A}$ -receptors' action causes a division of rat striatal projections neurons in two halves: one half showing the response and the other without the response. These results were very consistent and reproducible in the different experimental samples. It is also known that striatal projection neurons are divided in halves: one half corresponds to the direct (dSPNs) and the other to the indirect (iSPNs) basal ganglia pathways. And finally, it is known that indirect pathway neurons (iSPNs) but not direct pathway neurons (dSPNs) express  $A_{2A}$ -receptors. Taken this information together, we infer that neurons with both  $A_1$  and  $A_{2A}$  responses are indirect pathway neurons. These neurons are precisely the neurons that increase their excitability during Parkinson's disease, when adenosine concentrations may be very high.



**Acknowledgments** We thank Antonio Laville, Gabriela X. Ayala, Adriana Hernandez, Mariana Duhnne, Ernesto A. Rendon, and Dagoberto Tapia for technical support and advice and to Dr. Claudia Rivera for animal care.

**Financial disclosure related to research covered in this article** This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología [CONACyT-México] grants 154131 and 98004 to JB and EG, respectively, by grants from Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM) to JB and EG, respectively, and by the Mexico-Germany Agreement Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-Deutsche Forschungsgemeinschaft (CONACyT-DFG) Grant I0110/193/10 FON.INST.-29-10 to JB. Hernandez-Gonzalez O, Hernandez-Flores T and Arias-García M have CONACyT doctoral fellowships. Data in this work are part of O H-G doctoral dissertation in the Posgrado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Prieto GA and Perez-Burgos A were graduate students in the same institution and had CONACyT doctoral fellowships. No conflicts of interest are declared.

**Financial disclosures of all authors [for the preceding 12 months]** Hernandez-Gonzalez O: Graduate student with a CONACyT scholarship.

Hernandez-Flores T: Graduate student with a CONACyT scholarship.

Prieto GA: On postdoctoral residence.

Perez-Burgos A: On postdoctoral residence.

Arias-García M: Graduate student with a CONACyT scholarship

Bargas J: Universidad Nacional Autónoma de México, Professor.

Galarraga E: Universidad Nacional Autónoma de México, Professor.

**Documentation of author roles** Hernandez-Gonzalez O: Design, execution of experiments, statistical analysis, and writing of the first draft of the manuscript. Hernandez-Flores T: execution of experiments. Arias-García M: execution of experiments. Prieto GA, Perez-Burgos A: execution of first experiments and assessment of viability. Bargas J: Conception, design, and organization of the research project. Galarraga E: Review, critique, and final organization of the manuscript.

## References

- DeLong M, Wichmann T (2009) Update on models of basal ganglia function and dysfunction. *Parkinsonism Relat Disord* 3:S237–S240
- Smith AD, Bolam JP (1990) The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurons. *Trends Neurosci* 13:259–265
- Kravitz AV, Freeze BS, Parker PR et al (2010) Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature* 466:622–626
- Vilchis C, Bargas J, Ayala GX, Galván E, Galarraga E (2000)  $Ca^{2+}$  channels that activate  $Ca^{2+}$ -dependent  $K^+$  currents in neostriatal neurons. *Neuroscience* 95:745–752
- Perez-Garci E, Bargas J, Galarraga E (2003) The role of  $Ca^{2+}$  channels in the repetitive firing of striatal projection neurons. *Neuroreport* 14:1253–1256
- Perez-Burgos A, Perez-Rosello T, Salgado H et al (2008) Muscarinic M(1) modulation of N and L types of calcium channels is mediated by protein kinase C in neostriatal neurons. *Neuroscience* 155:1079–1097
- Tritsch NX, Sabatini BL (2012) Dopaminergic modulation of synaptic transmission in cortex and striatum. *Neuron* 76:33–50
- Hernandez-López S, Bargas J, Surmeier DJ, Reyes A, Galarraga E (1997) D1 receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type  $Ca^{2+}$  conductance. *J Neurosci* 17:3334–3342
- Hernandez-López S, Tkatch T, Perez-Garci E, Galarraga E, Bargas J, Hamm H, Surmeier DJ (2000) D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-Type  $Ca^{2+}$  currents and excitability via a novel PLC $\beta$ 1–IP3–calcineurin-signaling cascade. *J Neurosci* 20:8987–8995
- Gerfen CR, Surmeier DJ (2011) Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annu Rev Neurosci* 34:441–466
- Svenningsson P, Le Moine C, Fisone G, Fredholm BB (1999) Distribution, biochemistry and function of striatal adenosine A2A receptors. *Prog Neurobiol* 59:355–396
- Yabuuchi K, Kuroiwa M, Shuto T et al (2006) Role of adenosine A1 receptors in the modulation of dopamine D1 and adenosine A2A receptor signaling in the neostriatum. *Neuroscience* 141:19–25
- Morsau JL, Huber G (1999) Central adenosine A(2A) receptors: an overview. *Brain Res Rev* 31:65–82
- Linden J (1991) Structure and function of A1 adenosine receptors. *FASEB J* 5:2668–2676
- Noguchi J, Yamashita H (2000) Adenosine inhibits voltage-dependent  $Ca^{2+}$  currents in rat dissociated supraoptic neurons via A1 receptors. *J Physiol* 526:313–326
- Song WJ, Tkatch T, Surmeier DJ (2000) Adenosine receptor expression and modulation of  $Ca^{2+}$  channels in rat striatal cholinergic interneurons. *J Neurophysiol* 83:322–332
- McCool BA, Farroni JS (2001) A1 adenosine receptors inhibit multiple voltage-gated  $Ca^{2+}$  channel subtypes in acutely isolated rat basolateral amygdala neurons. *Br J Pharmacol* 132:879–888
- Park KS, Jeong SW, Cha SK et al (2001) Modulation of N-type  $Ca^{2+}$  currents by A1-adenosine receptor activation in male rat pelvic ganglion neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 299:501–508
- Mogul DJ, Adams ME, Fox AP (1993) Differential activation of adenosine receptors decreases N-type but potentiates P-type  $Ca^{2+}$  current in hippocampal CA3 neurons. *Neuron* 10:327–334
- Zhu Y, Ikeda SR (1993) Adenosine modulates voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels in adult rat sympathetic neurons. *J Neurophysiol* 70:610–620
- Umeyama M, Berger AJ (1994) Activation of adenosine A1 and A2 receptors differentially modulates calcium channels and glycinergic synaptic transmission in rat brainstem. *Neuron* 13:1439–1446
- Haas HL, Selbach O (2000) Functions of neuronal adenosine receptors. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 362:375–381
- Ponzio TA, Hatton GI (2005) Adenosine postsynaptically modulates supraoptic neuronal excitability. *J Neurophysiol* 93:535–547
- Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G et al (1994) Nomenclature and classification of purinoreceptors. *Pharmacol Rev* 46:143–156
- Palmer TM, Stiles GL (1995) Adenosine receptors. *Neuropharmacology* 34:683–694
- Kull B, Svenningsson P, Fredholm BB (2000) Adenosine A2A receptors are colocalized with and activate Golf in rat striatum. *Mol Pharmacol* 58:771–777
- Corvol JC, Studler JM, Schonn JS, Girault JA, Hervé D (2001) Galpho(olf) is necessary for coupling D1 and A2A receptors to adenylyl cyclase in the striatum. *J Neurochem* 76:1585–1588
- Hervé D, Le Moine C, Corvol JC et al (2001) G(olf) levels are regulated by receptor usage and control dopamine and adenosine action in the striatum. *J Neurosci* 21:4390–4399
- Jenner P, Mori A, Hauser R, Morelli M, Fredholm BB, Chen JF (2009) Adenosine, adenosine A2A antagonists, and Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 15:406–413
- Okada Y, Sakurai T, Mori M (1992) Excitatory effects of adenosine on neurotransmission is due to increase of transmitter release in the hippocampal slices. *Neurosci Lett* 142:233–236
- Azad K, Gall D, Woods AS, Ledent C, Ferré S, Schiffmann SN (2009) Dopamine D2 and adenosine A2A receptors regulate NMDA-

- mediated excitation in accumbens neurons through A2A-D2 receptor heteromerization. *Neuropsychopharmacol* 34:972–986
32. Dixon AK, Widdowson L, Richardson PJ (1997) Desensitisation of the adenosine A1 receptor by the A2A receptor in the rat striatum. *J Neurochem* 69:315–321
  33. Higley MJ, Sabatini BL (2010) Competitive regulation of synaptic  $\text{Ca}^{2+}$  influx by D2 dopamine and A2A adenosine receptors. *Nat Neurosci* 13(8):958–66
  34. Peterson JD, Goldberg JA, Surmeier DJ (2012) Adenosine A2A receptor antagonists attenuate striatal adaptations following dopamine depletion. *Neurobiol Dis* 45:409–416
  35. Nöthenberg W, Wirkner K, Assmann H, Richter M, Illes P (1998) Adenosine A2A receptors inhibit the conductance of NMDA receptor channels in rat neostriatal neurons. *Amino Acids* 14:33–39
  36. Lopes LV, Cunha AR, Ribeiro JÁ (1999) Cross talk between A(1) and A(2A) adenosine receptors in the hippocampus and cortex of young adult and old rats. *J Neurophysiol* 82:3196–3203
  37. Lopes LV, Cunha RA, Kull B, Fredholm BB, Ribeiro JÁ (2002) Adenosine A(2A) receptor facilitation of hippocampal synaptic transmission is dependent on tonic A(1) receptor inhibition. *Neurosci* 112:319–329
  38. Prieto GA, Perez-Burgos A, Fjordelisio T et al (2009) Dopamine D(2)-class receptor supersensitivity as reflected in  $\text{Ca}^{2+}$  current modulation in neostriatal neurons. *Neurosci* 164:345–350
  39. Yan Z, Surmeier DJ (1996) Muscarinic (m2/m4) receptors reduce N- and P-type  $\text{Ca}^{2+}$  currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a fast, membrane-delimited, G protein pathway. *J Neurosci* 16:2592–2604
  40. Bargas J, Howe A, Eberwine J, Cao Y, Surmeier DJ (1994) Cellular and molecular characterization of  $\text{Ca}^{2+}$  currents in acutely isolated, adult rat neostriatal neurons. *J Neurosci* 14:6667–6686
  41. Perez-Rosello T, Figueroa A, Salgado H et al (2005) Cholinergic control of firing pattern and neurotransmission in rat neostriatal projection neurons: role of  $\text{CaV}2.1$  and  $\text{CaV}2.2$   $\text{Ca}^{2+}$  channels. *J Neurophysiol* 93:2507–2519
  42. Salgado H, Tecuapetla F, Perez-Rosello T et al (2005) A reconfiguration of  $\text{CaV}2$   $\text{Ca}^{2+}$  channel current and its dopaminergic D2 modulation in developing neostriatal neurons. *J Neurophysiol* 94:3771–3787
  43. Sebastião AM, Macedo MP, Ribeiro JÁ (2000) Tonic activation of A(2A) adenosine receptors unmasks, and of A(1) receptors prevents, a facilitatory action of calcitonin gene-related peptide in the rat hippocampus. *Br J Pharmacol* 129:374–380
  44. Cunha-Reis D, Fontinha BM, Ribeiro JA, Sebastião AM (2007) Tonic adenosine A1 and A2A receptor activation is required for the excitatory action of VIP on synaptic transmission in the CA1 area of the hippocampus. *Neuropharmacol* 52:313–320
  45. Cunha-Reis D, Ribeiro JA, Sebastião AM (2008) A1 and A2A receptor activation by endogenous adenosine is required for VIP enhancement of  $\text{K}^{+}$ -evoked (3H)-GABA release from rat hippocampal nerve terminals. *Neurosci Lett* 430:207–212
  46. Ciruela F, Casadó V, Rodrigues RJ et al (2006) Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A1-A2A receptor heteromers. *J Neurosci* 26:2080–2087
  47. Vivas O, Arenas I, García DE (2012) Voltage-independent inhibition of  $\text{CaV}2.2$  channels is delimited to a specific region of the membrane potential in rat SCG neurons. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 44:544–549
  48. Martella G, Spadoni F, Sciamanna G, Tassone A, Bernardi G, Pisani A, Bonsi P (2008) Age-related functional changes of high-voltage-activated calcium channels in different neuronal subtypes of mouse striatum. *Neurosci* 152:469–476
  49. Schiffmann SN, Fisone G, Moresco R, Cunha RA, Ferré S (2007) Adenosine A2A receptors and basal ganglia physiology. *Prog Neurobiol* 83:277–292
  50. Hagberg H, Andersson P, Lacarewicz J, Jacobson I, Batchter S, Sandberg M (1987) Extracellular adenosine, inosine, hypoxanthine, and xanthine in relation to tissue nucleotides and purines in rat striatum during transient ischemia. *J Neurochem* 49:227–231
  51. Pazzagli M, Corsi C, Fratti S, Pedata F, Pepeu G (1995) Regulation of extracellular adenosine levels in the striatum of aging rats. *Brain Res* 684:103–106
  52. Latini S, Pedata F (2001) Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J Neurochem* 79:463–484
  53. Pedata F, Corsi C, Melani A, Bordoni F, Latini S (2001) Adenosine extracellular brain concentrations and role of A2A receptors in ischemia. *Ann N Y Acad Sci* 939:74–84
  54. Pinna A, Corsi C, Carta AR, Valentini V, Pedata F, Morelli M (2002) Modification of adenosine extracellular levels and adenosine A(2A) receptor mRNA by dopamine denervation. *Eur J Pharmacol* 446:75–82
  55. Gianfriddo M, Melani A, Turchi D, Giovannini MG, Pedata F (2004) Adenosine and glutamate extracellular concentrations and mitogen-activated protein kinases in the striatum of Huntington transgenic mice. Selective antagonism of adenosine A2A receptors reduces transmitter outflow. *Neurobiol Dis* 17:77–88
  56. Sciotti VM, Park TS, Berne RM, Van Wylen DG (1993) Changes in extracellular adenosine during chemical or electrical brain stimulation. *Brain Res* 613:16–20
  57. Chechova S, Venton BJ (2008) Transient adenosine efflux in the rat caudate-putamen. *J Neurochem* 105:1253–1263
  58. Cunha RA, Vizi ES, Ribeiro JA, Sebastião AM (1996) Preferential release of ATP and its extracellular catabolism as a source of adenosine upon high- but not low-frequency stimulation of rat hippocampal slices. *J Neurochem* 67:2180–2187
  59. Gonçalves J, Queiroz G (1993) Facilitatory and inhibitory modulation by endogenous adenosine of noradrenaline release in the epididymal portion of rat vas deferens. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol* 348:367–371
  60. Correia-de-Sá P, Timóteo MA, Ribeiro JÁ (1996) Presynaptic A1 inhibitory/A2A facilitatory adenosine receptor activation balance depends on motor nerve stimulation paradigm at the rat hemidiaphragm. *J Neurophysiol* 76:3910–3919
  61. Correia-de-Sá P, Ribeiro JÁ (1996) Adenosine uptake and deamination regulate tonic A2A receptor facilitation of evoked (3H)acetylcholine release from the rat motor nerve terminals. *Neuroscience* 73:85–92
  62. Latini S, Pazzagli M, Pepeu G, Pedata F (1996) A2 adenosine receptors: their presence and neuromodulatory role in the central nervous system. *Gen Pharmacol* 27:925–933
  63. Salmi P, Chergui K, Fredholm BB (2005) Adenosine-dopamine interactions revealed in knockout mice. *J Mol Neurosci* 26:239–244
  64. Fuxe K, Ferré S, Genedani S, Franco R, Agnati LF (2007) Adenosine receptor-dopamine receptor interactions in the basal ganglia and their relevance for brain function. *Physiol Behav* 92:210–217
  65. Ribeiro JA (1999) Adenosine A2A receptor interactions with receptors for other neurotransmitters and neuromodulators. *Eur J Pharmacol* 375:101–113
  66. Duarte-Araújo M, Nascimento C, Alexandrina Timóteo M, Magalhães-Cardoso T, Correia-de-Sá P (2004) Dual effects of adenosine on acetylcholine release from myenteric motoneurons are mediated by junctional facilitatory A(2A) and extrajunctional inhibitory A(1) receptors. *Br J Pharmacol* 141:925–934
  67. Mynlieff M, Beam KG (1994) Adenosine acting at an A1 receptor decreases N-type calcium current in mouse motoneurons. *J Neurosci* 14:3628–3634
  68. Budd DC, Nicholls DG (1995) Protein kinase C-mediated suppression of the presynaptic adenosine A1 receptor by a facilitatory metabotropic glutamate receptor. *J Neurochem* 65:615–621

69. Ambrósio AF, Malva JO, Carvalho AP, Carvalho CM (1996) Modulation of  $\text{Ca}^{2+}$  channels by activation of adenosine A1 receptors in rat striatal glutamatergic nerve terminals. *Neurosci Lett* 220:163–166
70. Ambrósio AF, Malva JO, Carvalho AP, Carvalho CM (1997) Inhibition of N-P/Q- and other types of  $\text{Ca}^{2+}$  channels in rat hippocampal nerve terminals by the adenosine A1 receptor. *Eur J Pharmacol* 340:301–310
71. Zamponi GW, Snutch TP (1998) Modulation of voltage-dependent calcium channels by G proteins. *Curr Opin Neurobiol* 8:351–356
72. Kaneko S, Akaike A, Satoh M (1999) Receptor-mediated of voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels via heteromeric G-proteins in neurons. *Jpn J Pharmacol* 81:324–331
73. Chiang B, Bekkers JM (2001) Inhibition of calcium channels by opioid- and adenosine-receptor agonists in neurons of the nucleus accumbens. *Br J Pharmacol* 133:337–344
74. Okada M, Nutt DJ, Murakami T, Zhu G, Kamata A, Kawata Y, Kaneko S (2001) Adenosine receptor subtypes modulate two major functional pathways for hippocampal serotonin release. *J Neurosci* 21:628–640
75. Tedford HW, Zamponi GW (2006) Direct G protein modulation of Cav2 calcium channels. *Pharmacol Rev* 58:837–862
76. Olson PA, Tkatch T, Hernandez-Lopez S, Ulrich S, Ilijic E, Mugnaini E, Zhang H, Bezprozvanny I, Surmeier DJ (2005) G-protein-coupled receptor modulation of striatal CaV1.3 L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels is dependent on a Shank-binding domain. *J Neurosci* 25(5):1050–62
77. Oliveira L, Timóteo MA, Correia-de-Sá P (2004) Tetanic depression is overcome by tonic adenosine A(2A) receptor facilitation of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  influx into rat motor nerve terminals. *J Physiol* 560:157–168