



UADY

CIENCIAS DE LA SALUD

POSGRADO INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS DE LA SALUD

Universidad Autónoma de Yucatán
Posgrado Institucional en Ciencias de la Salud

Estudio de la influencia de la depleción dopaminérgica estriatal
sobre la modulación de la transmisión sináptica excitadora de la
vía corticoestriatal por los receptores de adenosina A1 y A2A

Tesis presentada por:

LN ANA ROSA FERNÁNDEZ FAUSTO

En opción al grado:

Maestra en Investigación en Salud

Director de Tesis:

Dr. José Luis Góngora Alfaro

Co-Director de Tesis:

Dr. Humberto Salgado Burgos

Mérida, Yucatán, México
2017

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de tesis fue financiado con recursos del Consejo nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT), otorgados al Dr. José Luis Góngora Alfaro a través del convenio No. 256878. De igual forma, esta tesis no se hubiera realizado sin el apoyo otorgado por el Consejo nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT) en la Convocatoria de becas nacionales 2014, segundo periodo.

A mis padres y hermana, quienes me ofrecieron su apoyo incondicional, amor y paciencia durante todo el proceso de la obtención del grado de Maestría. A todos les agradezco por los valores que me han enseñado y por ayudarme a continuar con esta meta.

A mi novio, Luis Alberto, quien día a día me demostró su apoyo, amor y paciencia que me motivaron a seguir adelante a pesar de las circunstancias adversas.

A mis asesores de tesis, el Dr. José Luis Góngora Alfaro y el Dr. Humberto Salgado Burgos, quienes me brindaron todas las facilidades para la realización de todos los experimentos; así como los consejos, sugerencias y apoyo moral que me motivaron a continuar y a mejorar tanto a nivel personal y profesional.

A los revisores de tesis, cuyos comentarios y sugerencias aportados contribuyeron a mejorar continuamente este trabajo.

Al Mtro. Fernando Álvarez Cervera, por la asesoría para la realización de los experimentos, así como las sugerencias y el apoyo brindado durante este proceso.

ÍNDICE

1. RESUMEN	11
2. INTRODUCCIÓN	13
3. MARCO TEÓRICO	15
3.1 Control cerebral de los movimientos.	15
3.2 Neuronas espinosas medianas (NEMs) del cuerpo estriado.....	16
3.3 Tipos de neuronas espinosas medianas del cuerpo estriado: vías directa e indirecta... 17	
3.4 La vía corticoestriatal.....	18
3.5 Función de la dopamina y sus receptores.....	21
3.6 Función de la adenosina y sus receptores.....	23
3.7 Interacción funcional de los receptores A1 y D1 en las NEMs de la vía directa	25
3.8 Interacción funcional de los receptores A2A y D2 en las NEMs de la vía indirecta ...	26
3.9 Interacción funcional de los receptores A1 y A2A en la terminal corticoestriatal.....	28
3.10 Función global del circuito motor extrapiramidal.....	29
3.11 Función del circuito motor en la Enfermedad de Parkinson	31
3.12 Papel de los receptores A1 y A2A en la enfermedad de Parkinson	32
3.13 Evidencias morfológicas de la expresión de receptores A1 y A2A en botones sinápticos de la vía corticoestriatal.	33
3.14 Evidencia neuroquímica de modulación adenosinérgica de la transmisión sináptica corticoestriatal.....	34
3.15 Evidencias electrofisiológicas de modulación adenosinérgica de la transmisión sináptica corticoestriatal.....	35
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	41
5. JUSTIFICACIÓN	43
6. OBJETIVOS	45
6.1 OBJETIVO GENERAL.....	45
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
6.3 HIPÓTESIS.....	46
7. METODOLOGÍA	47
7.1 Animales	47
7.2 Modelo farmacológico de parkinsonismo causado por el agotamiento de la dopamina con reserpina.	47
7.3 Validación del esquema de reserpización mediante la prueba de catalepsia	54
7.4 Alimentación intragástrica	55
7.5 Prueba de catalepsia	57
7.6 Obtención de las rebanadas de cerebro	59
7.7 Registros electrofisiológicos	62
7.8 Protocolo de pulso pareado	65
7.9 Fármacos	66
7.10 Análisis estadístico.....	68
8. RESULTADOS	69
8.1 Estandarización y validación del modelo de parkinsonismo inducido con reserpina. .	69
8.1.1 Efecto de la reserpina sobre el consumo de agua y alimento.....	69
8.1.2 Efecto de la reserpina sobre el peso corporal.....	71
8.1.3 Efecto de la reserpina sobre la prueba de catalepsia.	73
8.2 Efecto de la depleción de dopamina sobre la modulación de la transmisión excitadora corticoestriatal mediada por los receptores de adenosina de tipo A1 y A2A.....	74

8.2.1 Efecto de la depleción de dopamina sobre la modulación de la transmisión excitadora corticoestriatal mediada por los receptores A1.	78
8.2.2 Efecto de la depleción de dopamina sobre la modulación de la transmisión excitadora corticoestriatal mediada por los receptores A2A	90
9. DISCUSION	102
9.1.1 Efecto de la reserpina sobre el consumo de agua y alimento.	102
9.1.2 Efecto de la reserpina sobre el peso corporal.	103
9.1.3 Efecto de la reserpina sobre la catalepsia.	105
9.2 Efecto de la depleción de dopamina sobre la modulación de la transmisión excitadora corticoestriatal mediada por los receptores A1.	106
9.3 Efecto de la depleción de dopamina sobre la modulación de la transmisión excitadora corticoestriatal mediada por los receptores A2A	108
10. CONCLUSIONES	114
11. SUGERENCIAS PARA FUTURAS INVESTIGACIONES	116
12. REFERENCIAS	117
13. ANEXO 1	126

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura anatómica los ganglios de la base.	15
Figura 2. Neurona espinosa mediana del estriado de monos Rhesus (<i>Macaca mulatta</i>).	16
Figura 3. Vías directa e indirecta del circuito motor.	18
Figura 4. Estados de excitabilidad de las neuronas espinosas medianas.	20
Figura 5. Liberación de glutamato desde las neuronas de la corteza.	23
Figura 6. Interacción de los receptores A1 y D1 postsinápticos expresados en las NEMs de la vía directa.	26
Figura 7. Interacción de los receptores A2A y D2 postsinápticos expresados en las NEMs de la vía indirecta.	27
Figura 8. Interacción de los receptores A1 y A2A presinápticos.	29
Figura 9. Circuito motor de los ganglios basales en la enfermedad de Parkinson. ...	32
Figura 10. Efecto de la administración de reserpina en las terminales nerviosas.	48
Figura 11. Esquema de tratamiento farmacológico con reserpina.	52
Figura 12. Inyección subcutánea.	53
Figura 13. Administración de la alimentación intragástrica a los animales tratados con reserpina.	56
Figura 14. Rata en caja de catalepsia.	57
Figura 15. Estandarización de la prueba de catalepsia.	59
Figura 16. Perfusión intracardíaca con solución salina baja en sodio.	60
Figura 17. Procedimiento de Whole-cell patch-clamp.	63
Figura 18. Medición de la corriente postsináptica excitadora (CPSE).	64
Figura 19. Técnica del Protocolo de pulso pareado.	66

Figura 20. Efecto del tratamiento con reserpina en el consumo de agua y alimento.	71
Figura 21. Efecto del tratamiento con reserpina en el peso corporal.....	72
Figura 22. Efecto del tratamiento con reserpina sobre la prueba de catalepsia.	74
Figura 23. Tiempo de descenso de la barra metálica (s) obtenido en el día 4 de tratamiento en las ratas reserpinizadas y no reserpinizadas.....	77
Figura 24. Efecto del agonista A1 (CCPA) sobre la amplitud normalizada de las CPSEs en NEMs representativas de ratas tratadas con vehículo (no reserpinizadas) y con reserpina.....	79
Figura 25. Efecto del agonista A1 sobre el curso temporal de la amplitud normalizada de las CPSEs inducidas por estimulación corticoestriatal en las NEMs de ratas reserpinizadas y no reserpinizadas (Vehículo).	80
Figura 26. Amplitud de las CPSEs antes y después de la aplicación del agonista selectivo de receptores de adenosina de tipo A1.....	82
Figura 27. Tiempo (min) en que se alcanza el 50% de la máxima inhibición de la amplitud de las corrientes sinápticas de las NEMs tras la aplicación del agonista A1.83	
Figura 28. Cambio porcentual del cociente de pulso pareado (CPP: S2/S1) después de la aplicación del agonista selectivo de los receptores de adenosina de tipo A1.	84
Figura 29. Efecto del agonista A1 sobre el porcentaje de cambio de la amplitud de las CPSEs normalizadas y del CPP inducido por la estimulación corticoestriatal en las NEM de ratas no reserpinizadas y tratadas con reserpina.	86
Figura 30. Interacción del antagonista A1 (DPCPX) y el agonista A1 (CCPA) sobre la amplitud normalizada de las CPSEs en las NEMs de ratas tratadas con el vehículo (no reserpinizadas).	88
Figura 31. Interacción del antagonista A1 (DPCPX) y el agonista A1 (CCPA) sobre la amplitud normalizada de las CPSEs en las NEMs de ratas tratadas con reserpina. ..	89
Figura 32. Efecto del agonista A2A (CGS 21680) sobre la amplitud normalizada de de las CPSEs en NEMs representativas de ratas tratadas con vehículo (no reserpinizadas) y con reserpina.	91
Figura 33. Efecto del agonista A2A sobre el curso temporal de la amplitud normalizada de las CPSEs inducidas por estimulación corticoestriatal en las NEM de ratas reserpinizadas y no reserpinizadas (Vehículo).	93

Figura 34. Amplitud de las CPSEs antes y después de la aplicación del agonista selectivo de receptores de adenosina de tipo A2A.....	95
Figura 35. Cambio porcentual del cociente de pulso pareado (CPP: S2/S1) después de la aplicación del agonista selectivo de los receptores de adenosina de tipo A2A.	96
Figura 36. Efecto del agonista A2A sobre el porcentaje de cambio de la amplitud de las CPSEs normalizadas y del CPP inducido por la estimulación corticoestriatal en las NEMs de ratas no reserpinizadas y tratadas con reserpina.	98
Figura 37. Interacción del antagonista A2A (ZM 241385) y el agonista A2A (CGS 21680) sobre la amplitud normalizada de las CPSEs en las NEMs de ratas tratadas con el vehículo (no reserpinizadas).	99
Figura 38. Interacción del antagonista A2A (ZM 241385) y el agonista A2A (CGS 21680) sobre la amplitud normalizada de las CPSEs en las NEMs de ratas tratadas con reserpina.	100
Figura 39. Interacción del antagonista A2A (ZM 241385) y el agonista A2A (CGS 21680) sobre la amplitud normalizada de las CPSEs en las NEMs de ratas tratadas con reserpina.	101
Figura 40. Circuito motor de los ganglios basales en la Enfermedad de Parkinson.	113

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición del vehículo para disolver la reserpina.	53
Tabla 2. Composición de la alimentación intragástrica.....	57
Tabla 3. Composición de la solución salina baja en Sodio.....	60
Tabla 4. Composición de la solución extracelular.....	61
Tabla 5. Composición de la solución intracelular.....	62
Tabla 6. Tabla de fármacos utilizados en los experimentos.	67
Tabla 7. Características de los animales utilizados para los registros electrofisiológicos.	75

ABREVIATURAS

6-OHDA: 6-hidroxidopamina.
A1: Receptor de adenosina de tipo A1.
A2A: Receptores de adenosina de tipo A2A.
ABC: Área bajo la curva.
AC: Adenilato ciclasa.
AMPA: α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico, receptor de glutamato.
AMPc: Adenosín monofosfato cíclico.
AMPT: α -metil-para-tirosina
ATP: Adenosín trifosfato.
CCPA: 2-chloro-N⁶-cyclopentyladenosine (agonista de los receptores de adenosina de tipo A1).
CGS 21680: 4-[2-[[6-amino-9-(N-ethyl-b-D-ribofuranuronamidossyl)-9H-purin-2-yl] amino]ethyl]benzene propanoic acid (agonista de los receptores de adenosina de tipo A2A).
CPA: N⁶-Cyclopentyladenosine (agonista de los receptores de adenosina de tipo A1).
CPP: Cociente de pulso pareado.
CPSEs: Corrientes postsinápticas excitadoras.
D1: Receptor de dopamina de tipo D1.
D2: Receptor de dopamina de tipo D2.
DARPP-32: fosfoproteína regulada por dopamina y AMPc.
DL₅₀: Dosis letal 50.
DMSO: Dimetil-sulfóxido.
DPCPX: 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (antagonista de los receptores de adenosina de tipo A1).
EP: Enfermedad de Parkinson.
GABA: Ácido γ -aminobutírico
GABA-A: Receptor de tipo A de ácido γ -aminobutírico
GPe: Globus pallidus externo
GPi: Globus pallidus interno
HP- β -CD: Hidroxipropil- β -ciclodextrina.
IP3: Inositol trifosfato.
mg: miligramo
mL: mililitro
mM: milimolar
ms: milisegundos
nM: nanomolar
 μ A: microamperios
 μ L: microlitros
 μ M: micromolar
 μ m: micrometros
 μ s: microsegundos
NEMs: Neuronas espinosas medianas.

NMDA: N-metil-D-aspartato (receptor de glutamato)
NST: Núcleo subtalámico.
pA: picoamperios
pDYN: Prodinorfina.
PKA: Proteína quinasa A.
PKC: Proteína quinasa C.
PLC β : Fosfolipasa C, subunidad β .
PPE: Preproencefalina.
PPSE: Potencial postsináptico excitador.
PPT: Preprotaquinina.
R-PIA: N⁶-(L-2-Phenylisopropyl) adenosina (agonista de los receptores de adenosina de tipo A1)
S2/S1: cociente de las amplitudes de las CPSEs inducidas por los estímulos 2 y 1.
SNc: Sustancia nigra compacta.
SNr: Sustancia nigra reticulata.
SP: Sustancia P.
vGluT1: transportadores vesiculares de glutamato de tipo 1.
vGluT2: transportadores vesiculares de glutamato de tipo 2.
VMAT-2: transportador vesicular de monoaminas-2.
ZM 241385: 4-(2-[7-amino-2-(2-furyl)[1,2,4]triazolo[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ylamino]ethyl)phenol (antagonista de los receptores de adenosina de tipo A2A).

1. RESUMEN

Evidencias morfológicas y electrofisiológicas indican la co-localización de los receptores de adenosina A1 y A2A en los botones sinápticos corticostriatales que modulan la liberación del glutamato, propiciando la excitación de las neuronas espinosas medianas (NEMs) del estriado. En las NEMs de la vía directa los receptores A1 se co-expresan con los receptores dopaminérgicos D1, y en las NEMs de la vía indirecta los receptores A2A se co-expresan con los dopaminérgicos D2, ejerciendo acciones antagonicas. El objetivo de este trabajo fue evaluar si la pérdida de inervación dopaminérgica altera la acción moduladora de los receptores A1 y A2A sobre la excitabilidad de las NEMs, y dilucidar si este efecto ocurre a nivel presináptico (terminales corticostriatales) o postsináptico (soma de las NEMs).

Se utilizaron ratas Wistar macho de 2 a 4 meses de edad formando dos grupos: grupo Vehículo (HP- β -CD) y grupo Reserpina. El esquema farmacológico de reserpina consistió en la administración de 3 dosis de reserpina: 5 mg/Kg (día 0) y 2 mg/Kg (días 2 y 4). Se les administró una alimentación intragástrica hipercalórica a las ratas reserpinizadas para atenuar la desnutrición producida durante el tratamiento de reserpina. Se evaluó la presencia de rigidez e inmovilidad en los animales a través de la prueba de catalepsia. Al quinto día de tratamiento se anestesió al animal, se realizó una perfusión intracardíaca con solución extracelular baja en sodio; se extrajo el cerebro y se obtuvieron rebanadas coronales de cerebro (250 – 270 μ m). Con las rebanadas se realizaron registros electrofisiológicos con la técnica Patch-Clamp con fijación de voltaje a -60 mV, se midieron los cambios en la amplitud de las corrientes postsinápticas excitadoras (CPSEs) y el cociente de pulso pareado tras la administración de fármacos agonistas y antagonistas de los receptores de adenosina A1 y A2A.

La alimentación intragástrica a los animales tratados con reserpina redujo en un 10% la disminución de peso al quinto día de tratamiento, sin producir modificaciones en los valores de catalepsia, ni en el consumo de agua y alimento.

La estimulación de los receptores A1, con el agonista selectivo CCPA (300 nM), produjo una disminución en la amplitud de las CPSEs en los grupos Vehículo (HP- β -

CD) y Reserpina, observando una tendencia, no significativa, a producir el efecto con mayor rapidez y magnitud en las ratas con depleción de dopamina. La estimulación de los receptores A1 con el CCPA produjo un aumento significativo en el cociente de pulso pareado (CPP) solo en las NEMs de ratas tratadas con reserpina, sugiriendo que la depleción de dopamina favorece la inhibición presináptica de la liberación de glutamato ejercida a través de los receptores A1. El antagonista de los receptores A1, DPCPX (100 nM), bloqueó la inhibición de las CPSEs producidas por el agonista CCPA en las NEMs de las ratas de los grupos Vehículo y Reserpina. La estimulación de los receptores A2A, con el agonista selectivo CGS 21680 (5 μ M), produjo un aumento significativo en la amplitud de las CPSEs en las neuronas del grupo Reserpina, que se asoció con una disminución significativa en el CPP, sugiriendo que la depleción de dopamina favorece la actividad de los receptores A2A a nivel presináptico para aumentar la liberación de glutamato. La estimulación de los receptores A2A en las NEMs del grupo Vehículo produjo efectos más variables en la amplitud de las CPSEs, causando aumento en una, disminución en 4 y sin cambio en 2 neuronas. En presencia del antagonista A2A, ZM 241385, el agonista A2A, CGS 21680, no produjo un aumento de las CPSEs en las NEMs de las ratas tratadas con reserpina. Aún hacen falta más estudios para esclarecer el efecto de los antagonistas de los receptores A2A sobre la modulación de la excitabilidad de las neuronas espinosas medianas tras la estimulación de la vía corticoestriatal.

2. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson es considerada la segunda enfermedad neurodegenerativa en frecuencia después de la enfermedad de Alzheimer. La principal causa de su aparición es la destrucción de las células que producen dopamina, neurotransmisor que es secretado por un conjunto de estructuras localizadas en la base de los hemisferios cerebrales conocidas como ganglios de la base, que en conjunto con las proyecciones glutamatérgicas provenientes de la corteza conforman el circuito motor encargado del control de los movimientos voluntarios del cuerpo (1, 2).

Cerca del 95% de las neuronas del estriado son neuronas espinosas medianas (NEMs) que secretan principalmente el neurotransmisor ácido γ -amino-butírico (GABA) (1, 2, 3). Estas NEMs se segregan en dos grupos poblacionales conformando la vía directa, cuyas neuronas expresan a los receptores de dopamina D1 co-localizados con los receptores de adenosina A1; y la vía indirecta, en las cuales se expresan los receptores de dopamina D2 co-localizados con los receptores de adenosina A2A (1, 2, 4).

Algunos estudios han indicado que la activación de los receptores D1 aumenta la excitabilidad de las NEMs de la vía directa facilitando la liberación del GABA, sin embargo, este efecto es contrarrestado por la activación de los receptores A1 (5), sugiriendo una interacción funcional antagónica. De igual forma, la co-localización de los receptores D2/A2A modulan en forma antagónica la función de las NEMs en la vía indirecta al favorecer la probabilidad de liberación del GABA tras la activación de los receptores A2A, mientras que la estimulación de los receptores D2 bloquean dicha acción (6).

Los receptores A1 y A2A también se encuentran co-localizados a nivel presináptico en las terminales glutamatérgicas corticoestriatales en donde presentan una interacción antagónica intramembranal que modula la función de las NEMs. Así, la estimulación de los receptores A2A favorecer la probabilidad de liberación del

glutamato hacia el espacio extracelular promoviendo la excitabilidad de las NEMs en el estriado; mientras que la activación de los receptores A1 presenta efectos opuestos (7, 8).

Se ha observado que pacientes con Parkinson que consumen cafeína, un antagonista no selectivo de los receptores de adenosina A1 y A2A, presentan mejoría en los síntomas motores tales como la acinesia (incapacidad de realizar movimientos) (9, 10, 11). Estos resultados sugieren que los antagonistas de adenosina A1 y A2A pueden funcionar como una alternativa farmacológica para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Sin embargo, gran parte de los estudios realizados sobre la función de los receptores A1 y A2A en animales se han hecho en presencia de dopamina y a nivel postsináptico. Por tal motivo, el presente estudio tiene como finalidad esclarecer el funcionamiento de los receptores de adenosina A1 y A2A en la modulación de la transmisión glutamatérgica de la vía corticoestriatal tanto a nivel pre como postsináptico, utilizando modelos animales adultos con depleción de dopamina. La información obtenida contribuirá a la elaboración de posibles alternativas farmacológicas para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Control cerebral de los movimientos.

Con la finalidad de generar movimientos musculares del cuerpo humano se requiere de un procesamiento e integración de la información sensorial recibida en el cerebro en donde se planifica y coordina la ejecución de los movimientos voluntarios (1, 12). Lo anterior se logra gracias a un conjunto de núcleos cerebrales interconectados encargados del procesamiento de la información para el desarrollo y aprendizaje de actividades motoras (13). Este conjunto de núcleos, localizados en la base de los hemisferios cerebrales, se denominan ganglios de la base, y sus relaciones anatómicas en el cerebro humano se ilustran en el diagrama de la Figura 1. Los ganglios de la base incluyen el estriado (caudado y putamen), el globus pallidus pars externa (GPe), el globus pallidus pars interna (GPi), el núcleo subtalámico (NST), la sustancia nigra pars compacta (SNc) y la sustancia nigra pars reticulata (SNr) (4).

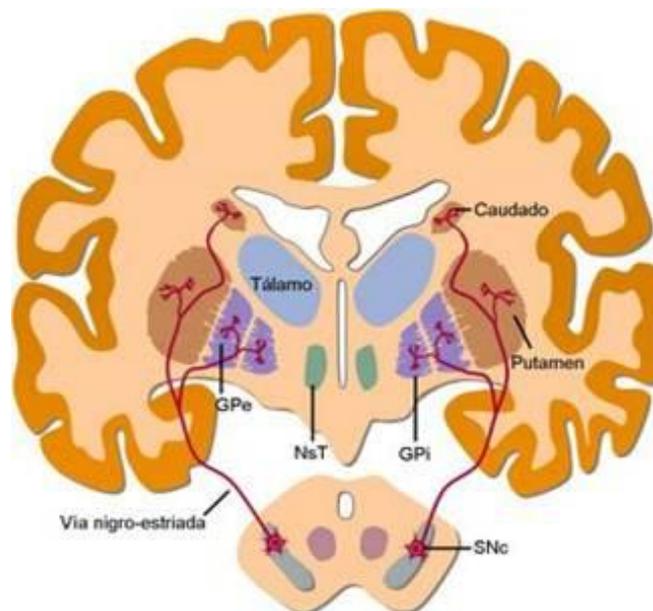


Figura 1. Estructura anatómica los ganglios de la base.

GPe: Globus pallidus pars externa, GPi: Globus pallidus pars interna, NST: Núcleo subtalámico, SNc: Sustancia nigra pars compacta.

3.2 Neuronas espinosas medianas (NEMs) del cuerpo estriado

Se ha formulado un modelo del funcionamiento de los ganglios de la base para el control de los movimientos, según el cual el estriado (principal núcleo de entrada del circuito motor) recibe información desde la corteza cerebral cuyas neuronas liberan el neurotransmisor excitador glutamato. Esta sustancia desempeña un papel importante en la regulación de la actividad de las neuronas espinosas medianas (NEMs), que constituyen cerca del 95% de la población neuronal total del estriado, las cuales utilizan al ácido γ -amino-butírico (GABA) como neurotransmisor. Una característica de las NEMs es que sus dendritas tienen numerosas evaginaciones membranosas conocidas como espinas dendríticas, cuya máxima densidad (1-2 dendritas por μm) ocurre a una distancia de 50 a 60 μm del soma, como se muestra en la Figura 2 (1, 3, 2).

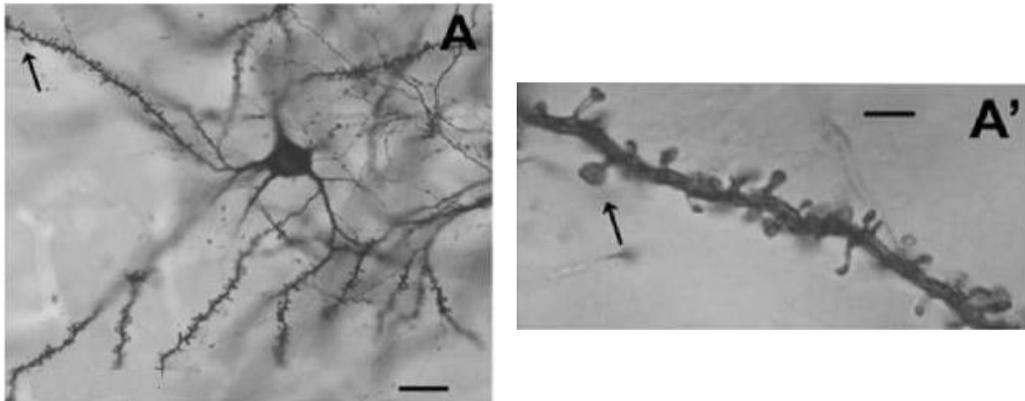


Figura 2. Neurona espinosa mediana del estriado de monos Rhesus (*Macaca mulatta*).

(A) Se muestra el soma y el árbol dendrítico de la neurona; la escala de la barra es de 25 μm . (A'). Segmento de una dendrita donde se aprecian las espinas dendríticas, una de las cuales está señalada con una flecha; la escala de la barra es de 5 μm . (Tomado de la referencia 14)

Las NEMs representan el punto de inicio del llamado circuito motor extrapiramidal, que se encarga de regular los movimientos musculares voluntarios a fin de que se ejecuten de manera fluida y coordinada. Para comprender su funcionamiento

es necesario describir las conexiones anatómicas de los distintos tipos de neuronas que lo conforman.

3.3 Tipos de neuronas espinosas medianas del cuerpo estriado: vías directa e indirecta

La vía directa del circuito motor está conformada, aproximadamente, por el 50% de las NEMs GABAérgicas del estriado (2, 15), que co-liberan los neuropéptidos sustancia P y dinorfina (una endorfina que disminuye el dolor) y co-expresan en sus membranas los receptores de dopamina D1 y de adenosina A1. Los axones de estas neuronas hacen sinapsis con las neuronas de la SNr y el GPi (conocidos como núcleos de salida), los cuales envían proyecciones GABAérgicas hacia los núcleos ventromedial y dorsomedial del tálamo que, en última instancia, proyectan terminales glutamatérgicas hacia la corteza motora, cerrando de este modo una parte del circuito motor extrapiramidal que coordina los movimientos voluntarios, como se ilustra en la Figura 3 (1, 2, 4, 16).

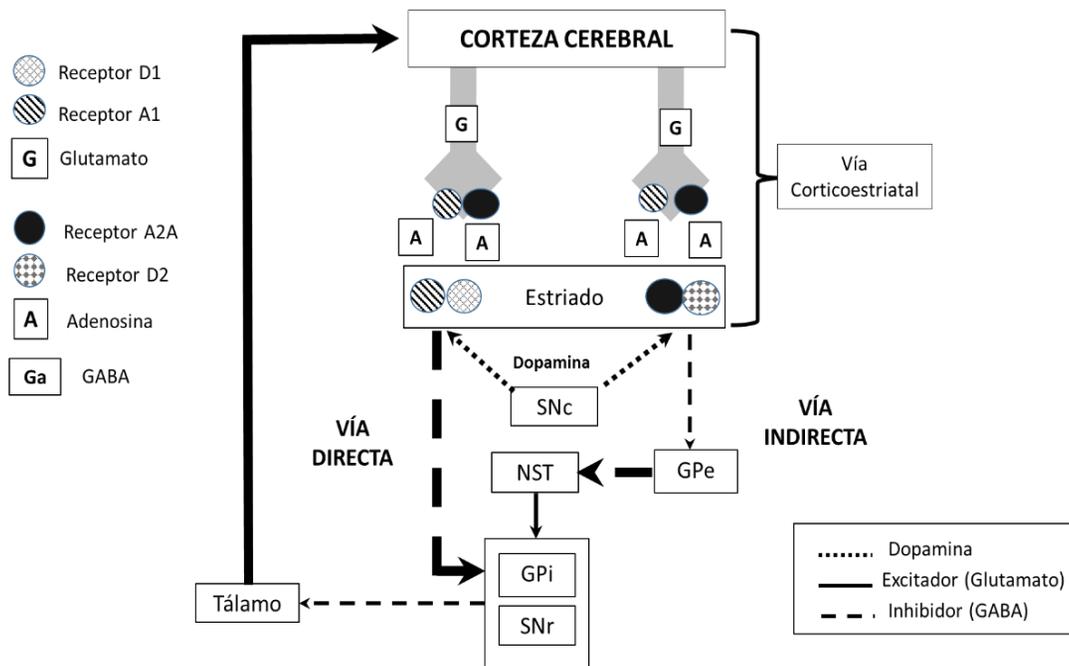


Figura 3. Vías directa e indirecta del circuito motor.

Los axones de las NEMs que co-expresan receptores A1/D1 constituyen la vía directa que proyecta hacia los núcleos de salida conformados por la sustancia nigra reticulata (SNr) y el globus pallidus interno (GPi). Los axones de las NEMs que co-expresan los receptores A2A/D2 dan origen a la vía indirecta que inerva al globus pallidus externo (GPe).

En contraste, el 50% restante de las NEMs GABAérgicas co-liberan encefalina (un neuropéptido que disminuye el dolor) y co-expresan los receptores de dopamina D2 y de adenosina A2A. Estas neuronas dan origen a la vía indirecta pues sus axones hacen sinapsis con las neuronas GABAérgicas del GPe, que a su vez hacen conexión con las neuronas glutamatérgicas del NST. Este último núcleo envía proyecciones excitadoras hacia los núcleos de salida (SNr y el GPi), promoviendo la generación de movimientos al estimular la corteza motora (1, 4, 16) (ver Fig. 3).

3.4 La vía corticoestriatal

La activación de las NEMs se encuentra regulada por las proyecciones glutamatérgicas provenientes de la corteza cerebral, conformando la vía corticoestriatal excitadora. Las neuronas piramidales de la capa V de la corteza cerebral forman sinapsis

exclusivamente en las espinas dendríticas de las NEMs del estriado, en donde se presenta una alta densidad de receptores AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico) y NMDA (N-metil-Aspartato), ambos de tipo ionotrópico. En estos receptores se une el glutamato liberado por las neuronas corticales, causando apertura del canal que permite la entrada de los iones sodio y calcio al interior de las NEMs, favoreciendo su despolarización y la generación de potenciales de acción con la subsiguiente liberación del neurotransmisor GABA (1, 2).

En estado de reposo, las NEMs están controladas por la salida de iones de potasio al exterior de la célula que mantiene el potencial de membrana a -80 mV, lejos del umbral de disparo; este estado hiperpolarizado es conocido como “down-state”. Por otro lado, cuando las sinapsis glutamatérgicas de la corteza cerebral convergen altamente en el espacio o en el tiempo en una misma neurona del estriado, se produce una despolarización progresiva que favorece la inactivación y cierre de los canales de potasio, incrementando dramáticamente el potencial de membrana a un valor cercano al umbral de disparo (-60 mV); este estado despolarizado es conocido como “up-state” y puede durar cientos de milisegundos (2) (ver Fig. 4). En este estado despolarizado se reconfigura el funcionamiento electrofisiológico de las NEMs, principalmente por el cierre o inactivación de los canales de potasio Kir2, Kv1 y Kv4 que se oponen a las influencias despolarizantes del glutamato liberado por la vía corticoestriatal (2, 17). Bajo estas condiciones es muy fácil que la entrada excitadora corticoestriatal desencadene potenciales de acción en las NEMs.

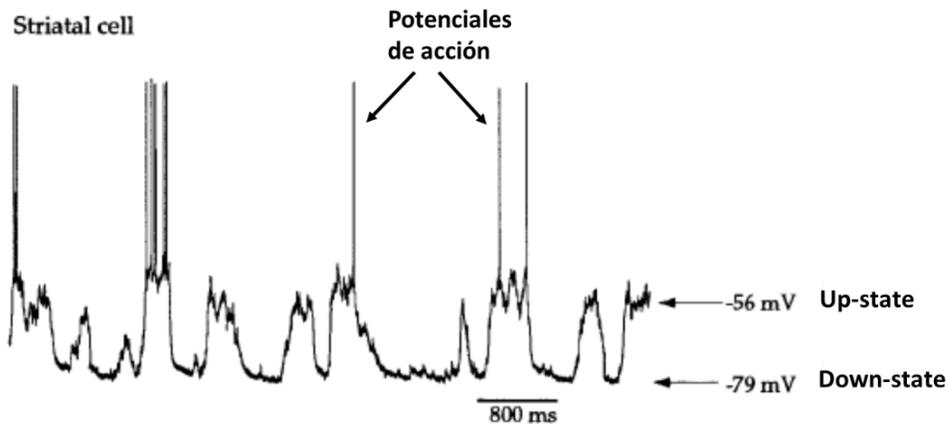


Figura 4. Estados de excitabilidad de las neuronas espinosas medianas.

El potencial de membrana de las neuronas espinosas medianas fluctúa entre dos estados. Cuando se encuentra cercano a -80 mV (“down state”) no se observa disparo de potenciales de acción. Por el contrario, cuando se despolariza a -60 mV (“up-state”) la neurona dispara con facilidad potenciales de acción que se propagan hacia la siguiente neurona. (Tomado de la referencia 18)

Sin embargo, la transición de cada estado de excitabilidad de las NEMs tras la liberación de glutamato en el estriado está modulada en gran medida por la estimulación de los receptores D1 y D2 por la dopamina secretada por las neuronas de la sustancia nigra pars compacta (1, 19) y también por la activación de los receptores A1 y A2A por la adenosina presente en el espacio extracelular, tal como ha sido reportado en un estudio (20). Ambas sustancias generan respuestas funcionales antagónicas entre sí que promueven la activación o inhibición de las neuronas del estriado dependiendo del tipo de receptor que sea activado (5) (ver Fig. 3).

Se ha observado que la activación de los receptores D2 en las NEMs de la vía indirecta reduce las corrientes entrantes de sodio y calcio e incrementa las corrientes salientes de potasio, produciendo una hiperpolarización de las NEMs que aleja el potencial de membrana del “up-state”. Estos cambios disminuyen el disparo de las neuronas de la vía indirecta y por consiguiente, se inhibe la liberación del GABA en el GPi (2).

Por otro lado, la activación de los receptores D1 en las NEMs de la vía directa incrementa las concentraciones de calcio intracelular y reduce las corrientes de potasio, favoreciendo el estado “up-state” que facilita la generación de potenciales de acción cuando se abren los receptores ionotrópicos AMPA por el glutamato liberado por las aferentes corticoestriatales; lo anterior promueve la liberación del neurotransmisor GABA en los núcleos de salida: GPe y SNr (2).

En conjunto con la dopamina, la adenosina juega un papel importante en la regulación de la excitabilidad de las NEMs puesto que la activación de sus receptores antagoniza los efectos desencadenados por los receptores de dopamina. A raíz de esto, algunos estudios han encontrado una interacción antagónica entre los receptores A1 y D1 en las NEMs de la vía directa y entre los receptores A2A y D2 en las NEMs de la vía indirecta (5, 21).

3.5 Función de la dopamina y sus receptores

La dopamina es un neuromodulador que produce sus efectos a través de cinco subtipos de receptores de dopamina, agrupados en dos familias: los de tipo D1 (D1 y D5) que activan a la enzima adenilato ciclasa y los de tipo D2 (D2, D3 y D4) que inhiben a dicha enzima, además de abrir canales de K^+ y cerrar canales de Ca^{2+} (22). En el estriado los receptores D2 presentan mayor afinidad por la dopamina que los D1, lo cual permite la activación de cada uno en función de la cantidad de dopamina liberada (2, 17, 23).

Las neuronas estriatonigrales de la vía directa expresan en sus somas una alta densidad de receptores D1, los cuales se acoplan a la enzima adenilato ciclasa a través de la proteína Gs/olf. La unión de la dopamina a estos receptores estimula la síntesis del AMPc (Adenosín monofosfato cíclico), un segundo mensajero que activa a la proteína cinasa A (PKA), que cataliza la unión de un grupo fosfato en el residuo de treonina 34 (Thr34) de la fosfoproteína regulada por dopamina y AMPc (DARPP-32). Estos eventos

traen como consecuencia un incremento en la expresión de los receptores de glutamato AMPA y NMDA en la superficie de las NEMs, así como un aumento de las corrientes de los canales de calcio y disminución de las corrientes de potasio (2, 17, 24). La respuesta inducida por la activación de los receptores D1 depende del nivel de polaridad (“up-state” [-60 mV] o en el “down-state” [-80 mV]) en el que se encuentren las NEMs al momento de ser estimulados estos receptores (2, 17). Puesto que en el “up-state” ocurre el cierre o inactivación de los canales de potasio y apertura de los canales de calcio (2, 17, 19), la activación de los receptores D1 facilita la acción excitadora del glutamato liberado por las aferentes corticoestriatales, lo que promueve la despolarización y el incremento del disparo de potenciales de acción de las NEMs de la vía directa (2, 17, 19).

Las NEMs estriatopalidales de la vía indirecta expresan en sus somas una alta densidad de receptores D2, que se encuentran acoplados a las proteínas Gi/o. Cuando los receptores D2 son activados la proteína Gi/o libera a la subunidad α que inhibe la actividad de la adenilato ciclasa. En paralelo, se libera la subunidad $\beta\gamma$ que estimula la activación de la fosfolipasa C (PKC) la cual cataliza la síntesis del inositol (1,4,5)-trifosfato (IP3), un segundo mensajero que provoca la liberación de iones Ca^{2+} de los depósitos intracelulares del retículo endoplásmico, activando a la calcineurina, una fosfatasa que desfosforila a los canales de Ca^{2+} de tipo L, reduciendo la excitabilidad de las NEMs de la vía indirecta inducida por el glutamato (17).

La liberación de glutamato de las neuronas corticales en la hendidura sináptica es un proceso regulado tanto por la presencia de adenosina como de dopamina, ambas ejerciendo efectos antagónicos que permiten una adecuada regulación en la liberación de este neurotransmisor y, por tanto, en la activación de las NEMs del estriado (ver Fig. 5).

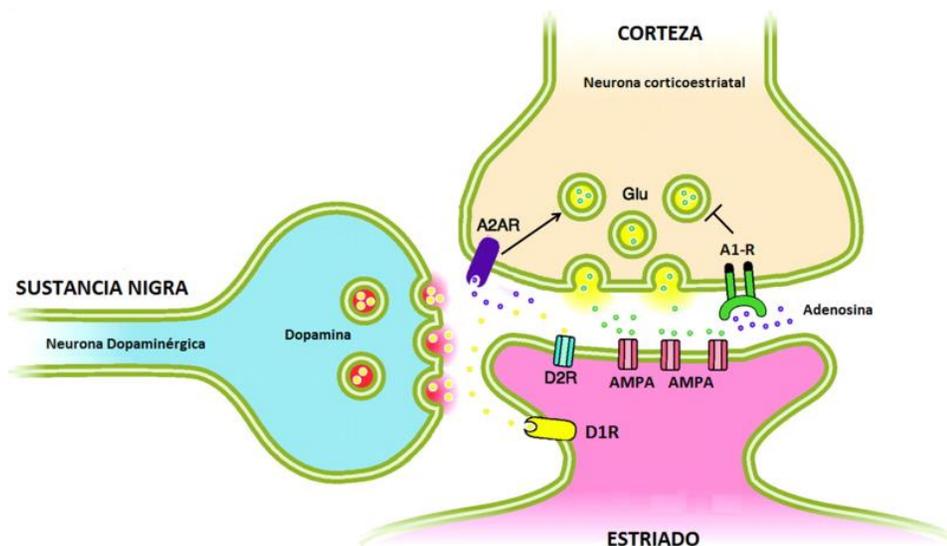


Figura 5. Liberación de glutamato desde las neuronas de la corteza.

La liberación de glutamato se encuentra regulada por la acción de ambos tipos de receptores de adenosina a nivel presináptico, en donde la activación de los receptores A1 inhibe su liberación mientras que los receptores A2A la favorecen. AMPA: receptor de glutamato, D2R: receptor de dopamina de tipo D2, D1R: receptor de dopamina de tipo D1, A2AR: receptor de adenosina de tipo A2A, Glu: Glutamato (Modificado de la referencia 25).

3.6 Función de la adenosina y sus receptores

La adenosina es un nucleósido formado por una base purínica (adenina) y una molécula de hidrato de carbono (ribosa) a partir de la hidrólisis del ATP por acción de enzimas intracelulares (endonucleotidasas) o extracelulares (ectonucleotidasas) (20, 26). La principal fuente de adenosina en el estriado de ratas es a nivel intracelular, como se ha reportado en un estudio (20); cuando su concentración dentro de la célula excede la del medio externo este nucleósido difunde pasivamente hacia el espacio extracelular a través de unas proteínas acarreadoras.

La adenosina actúa como un modulador en el cerebro, ejerciendo control autocrino y paracrino en diversas funciones de las células neuronales y gliales (27). En el sistema nervioso central la adenosina tiene efectos tanto a nivel presináptico como postsináptico a través de la activación de 4 subtipos de receptores acoplados a proteínas

G: A1, A2A, A2B y A3 (23, 27). La adenosina se une con gran afinidad a los receptores A1 (≈ 70 nM) seguido de los A2A (≈ 150 nM); ambos se expresan en abundancia en el cerebro de los mamíferos (27).

Algunos estudios han indicado que los receptores A1 se encuentran localizados en las NEMs GABAérgicas de la vía directa y en las aferentes excitadoras provenientes de la corteza cerebral (7, 13, 19, 28, 29). En las terminales corticoestriatales la activación de los receptores A1 acoplados a proteínas Gi/o inhibe la liberación de glutamato (19), posiblemente porque a nivel presináptico estos receptores causan el cierre de los canales de calcio de tipo N y porque promueven la apertura de algunos tipos de canales de potasio, provocando hiperpolarización del potencial de membrana (27, 30).

Por otro lado, los receptores A2A se expresan en alta densidad en las NEMs GABAérgicas estriatopalidales de la vía indirecta, co-localizados con los receptores de dopamina D2 (7, 8, 13, 28, 29). Los receptores A2A están acoplados a proteínas Gs, los cuales estimulan la actividad de la enzima adenilato ciclasa, incrementando la síntesis de AMPc encargada de la activación de la PKA. La activación de los receptores A2A aumenta la excitabilidad de las NEMs de la vía indirecta. Por otro lado, la activación de los receptores A2A expresado en las terminales corticoestriatales facilita la liberación de glutamato (29, 31) lo cual también contribuye a incrementar la excitabilidad de las NEMs del estriado (27).

La co-localización de los receptores de adenosina y dopamina tanto a nivel postsináptico, en el soma de las NEMs, como a nivel presináptico, en las terminales nerviosas de la vía corticoestriatal, sugiere que la adenosina interactúa con la dopamina para regular la actividad de las NEMs de ambas vías del circuito motor para la generación de los movimientos, como se explica en las secciones siguientes.

3.7 Interacción funcional de los receptores A1 y D1 en las NEMs de la vía directa

Se ha demostrado que la activación de los receptores D1 aumenta la acción excitadora del glutamato en las NEMs de la vía directa facilitando la liberación del neurotransmisor GABA en los núcleos de salida (GPe y SNr), sin embargo, este efecto es contrarrestado por la acción de los receptores A1, sugiriendo la existencia de una función antagónica entre ambos receptores (5, 32). El principal sitio de interacción de los receptores A1 y D1 es el soma y las dendritas de las NEMs de la vía directa en donde se modula el disparo de potenciales de acción que dan lugar a la liberación sináptica del GABA (23, 26, 32).

La activación eléctrica de las NEMs de la vía directa es modulada por la interacción intramembranal de los receptores D1 y A1 que involucra la activación o inhibición, respectivamente, de la enzima adenilato ciclasa encargada de sintetizar el segundo mensajero AMPc que activa a la PKA, la cual fosforila a los receptores glutamatergicos AMPA aumentando su permeabilidad al Ca^{2+} (7, 8). La unión de la adenosina a los receptores A1 promueve la activación de las proteínas Gi/o , cuya subunidad $\text{Gi}(\alpha)$ disminuye el estado de alta afinidad de los receptores D1 a la dopamina, que se encuentran acoplados a las proteínas Gs/olf , reduciendo la activación de adenilato ciclasa y la síntesis del AMPc (7, 8), que a su vez disminuye la actividad de la PKA y en consecuencia la fosforilación de los canales de glutamato AMPA, dando como resultado final una menor entrada de Ca^{2+} (4, 7, 8). Por otro lado la subunidad $\text{Gi}(\beta\gamma)$ se acopla a los canales de K^+ rectificadores entrantes aumentando su conductancia, lo cual favorece la salida de iones K^+ que propicia la hiperpolarización de la neurona hacia el “down-state”, inhibiendo la generación de potenciales de acción y la liberación del GABA (7, 8) (ver Fig. 6). Este efecto se ha observado en modelos animales en donde la aplicación de agonistas de los receptores A1 reduce sustancialmente la acumulación de AMPc inducida por los agonistas D1, inhibiendo la actividad motora de los animales, mientras que los antagonistas A1 tienen el efecto opuesto (6, 8).

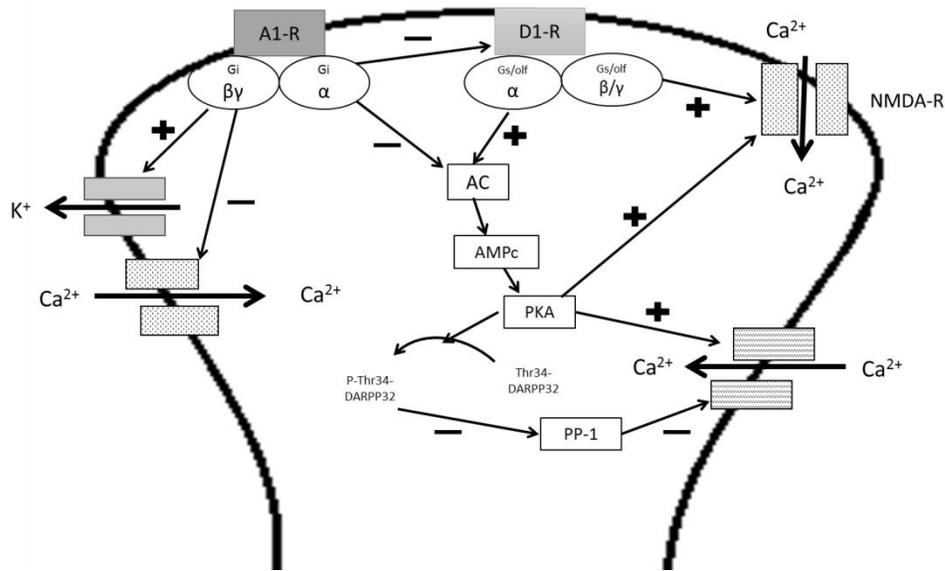


Figura 6. Interacción de los receptores A1 y D1 postsinápticos expresados en las NEMs de la vía directa.

A1-R: receptor de adenosina de tipo A1; D1-R: receptor de dopamina de tipo D1; DARPP-32: fosfoproteína regulada por AMPc dependiente de dopamina; NMDA-R: receptor de glutamato de tipo N-metil-D-aspartato; subtipos de proteínas G: Gs/olf, Gi; AC: adenilato ciclasa; AMPc: adenosín monofosfato cíclico; PKA: proteína cinasa A; PP-1: fosfatasa de proteínas tipo 1. (Modificado de la referencia 26).

3.8 Interacción funcional de los receptores A2A y D2 en las NEMs de la vía indirecta

En las NEMs de la vía indirecta existe una co-localización a nivel postsináptico de los receptores A2A y D2, principalmente en el cuello de las espinas dendríticas (7, 8). Cuando la inervación dopaminérgica está intacta, la dopamina endógena estimula fuertemente a los receptores D2 acoplados a las proteínas Gi/o, causando una inhibición tónica de la AC que inactiva la vía de señalización de AMPc/PKA inducida por los receptores A2A acoplados a proteínas Gs(olf) (7, 8). Por otra parte, en estas mismas neuronas los receptores D2 también están acoplados a la proteína Gq y su activación libera a la subunidad βγ que estimula la fosfolipasa Cβ (PLCβ) que cataliza la síntesis del inositol (1,4,5)-trifosfato (IP3), un segundo mensajero que provoca la liberación de

iones Ca^{2+} de los depósitos intracelulares del retículo endoplásmico, activando a la calcineurina, una fosfatasa que desfosforila a los canales de Ca^{2+} de tipo L (33), lo cual reduce la excitabilidad de las NEMs inducida por el glutamato (19).

En contraste, cuando se pierde la inervación dopaminérgica, sobresale la acción de los receptores A2A, los cuales ejercen un papel modulador controlando la actividad de la fosfoproteína regulada por AMPc dependiente de dopamina (DARPP-32), propiciando la sobre-excitación de las NEMs de la vía indirecta (34) (ver Fig. 7). La interacción intramembranal de los receptores A2A/D2 controla en forma antagónica la excitabilidad de las NEMs de la vía indirecta y, en consecuencia, su probabilidad de liberación de GABA en el GPe (35).

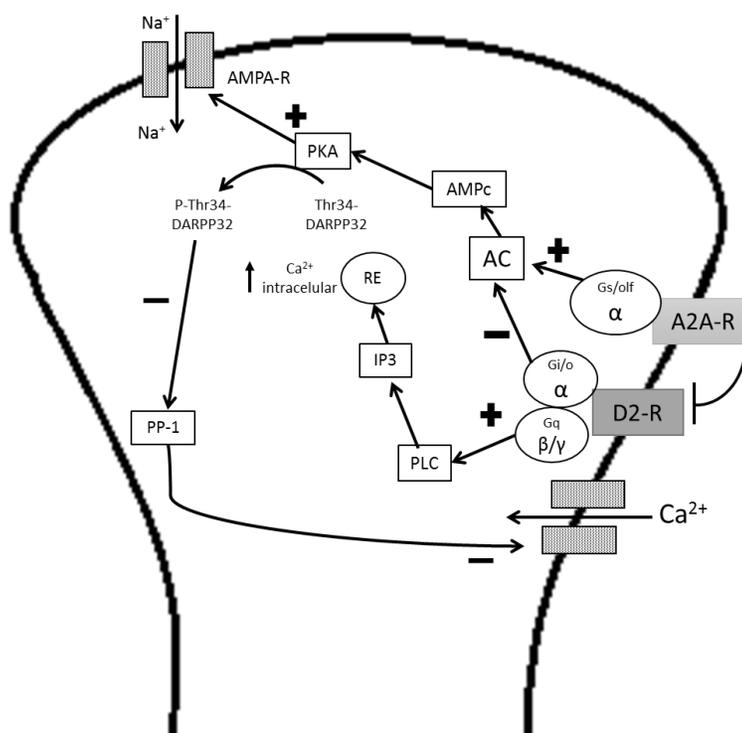


Figura 7. Interacción de los receptores A2A y D2 postsinápticos expresados en las NEMs de la vía indirecta.

A2A-R: receptor de adenosina; D2-R: receptor de dopamina; AMPA-R: receptor de glutamato; subtipos de proteínas G: Gs/olf, Gi, Gq; AC: adenilato ciclasa; AMPc: adenosín monofosfato cíclico; PKA: proteína cinasa A; PP-1: fosfatasa de proteínas tipo 1; PLC: fosfolipasa C; IP3: inositol (1,4,5)-trifosfato; RE: retículo endoplásmico. (Modificado de la referencia 26).

3.9 Interacción funcional de los receptores A1 y A2A en la terminal corticoestriatal

Los mecanismos neuronales que modulan la funcionalidad de los ganglios de la base podrían implicar también la activación de los receptores A1 y A2A a nivel presináptico. Estos dos receptores se encuentran co-localizados principalmente en las terminales glutamatérgicas corticoestriatales en donde presentan una interacción antagonista intramembranal (19), observándose que la estimulación de los receptores A2A disminuye la afinidad de los receptores A1 hacia sus agonistas; por el contrario, la estimulación de los receptores A1 inhibe la activación de la enzima AC mediada por los receptores A2A (7, 8). De igual forma, los cambios en la concentración de adenosina endógena producen cambios en la liberación del glutamato desde las terminales de la corteza cerebral hacia el estriado (7, 8). En condiciones basales, la baja concentración de adenosina endógena (≈ 70 nM) en la hendidura sináptica de las terminales nerviosas glutamatérgicas estriatales favorece la activación de los receptores A1 produciendo el cierre de los canales de calcio dependientes de voltaje, lo que disminuye la probabilidad de la liberación de glutamato. Por el contrario, la activación de los receptores A2A debido a una mayor concentración de adenosina (≈ 150 nM) produce un incremento en la secreción de este neurotransmisor (7, 8, 19, 27).

El hecho de que la secreción de glutamato en el espacio sináptico modifique el estado de excitabilidad de las NEMs de ambas vías pone de manifiesto la importancia que desempeñan los receptores A1 y A2A a nivel presináptico en la activación de las NEMs del estriado para la transmisión de la información y en consecuencia, en la generación de los movimientos del cuerpo (7, 8) (ver Fig. 8).

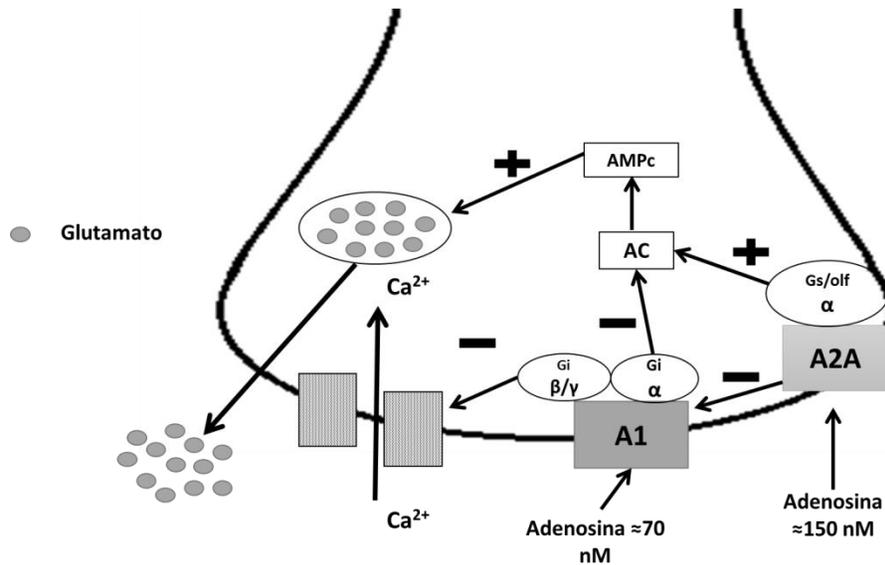


Figura 8. Interacción de los receptores A1 y A2A presinápticos.

A1: receptores de adenosina de tipo A1; A2A: receptores de adenosina de tipo A2A; subtipos de proteínas G: Gs/olf, Gi; AC: adenilato ciclasa, AMPc: adenosín monofosfato cíclico (Modificado de la referencia 8).

3.10 Función global del circuito motor extrapiramidal

La actividad del circuito motor extrapiramidal inicia cuando las neuronas piramidales de la corteza se activan y desencadenan la liberación de glutamato en la sinapsis corticoestriatal. Este último proceso está regulado por diversas sustancias, entre las que destaca la adenosina, que al activar los receptores A1 inhibe la liberación del glutamato mientras que la estimulación de los A2A promueve su secreción (6, 8). El glutamato liberado estimula a los receptores AMPA y NMDA en las espinas dendríticas de las NEMs, causando la despolarización de las neuronas e induciendo la generación de potenciales de acción y, en consecuencia, la liberación del GABA (7, 8).

Las NEMs también reciben inervación de las neuronas dopaminérgicas de la SNc, cuyas terminales hacen sinapsis en el cuello de las espinas dendríticas de las NEMs, ocupando una posición estratégica para modular la entrada excitadora corticoestriatal. En conjunto, la presencia de glutamato, adenosina y dopamina regulan

la actividad de las NEMs para la liberación del GABA en otras estructuras del circuito motor (36, 37).

Una vez que las NEMs reciben la información de ambos núcleos (corteza cerebral y SNc) ésta es procesada y el resultado (excitación o inhibición) dependerá del tipo de receptor dopaminérgico o de adenosina que exprese la neurona (6, 8, 34). Como se observa en la Figura 3, la estimulación de las NEMs de la vía directa inhibe a las neuronas GABAérgicas de los núcleos de salida, conformados por la SNr y el GPi, mientras que la activación de las NEMs de la vía indirecta inhibe a las neuronas GABAérgicas del GPe. Por su parte, las neuronas del GPe inhiben a las neuronas glutamatérgicas del NST, que hacen sinapsis excitadoras con las neuronas GABAérgicas de la SNr y del GPi. Estos núcleos de salida del circuito extrapiramidal envían proyecciones inhibitorias hacia el tálamo, estructura encargada de activar a la corteza cerebral para la generación de los movimientos voluntarios del cuerpo (36, 37).

Las NEMs de las vía directa e indirecta ejercen una influencia inhibitoria y excitadora, respectivamente, en la actividad neuronal de los núcleos de salida. Al estimular las NEMs de la vía directa se promueve la activación del tálamo; mientras que la activación de las NEMs de la vía indirecta desinhibe el NST, aumentando la actividad de los núcleos de salida (SNr/GPi) que ejercen un control inhibitorio en el tálamo (ver Fig. 3). De acuerdo con este modelo, se observa que la activación de la vía directa del circuito motor favorece los movimientos, mientras que la activación de la vía indirecta los inhibe, de tal forma ambas vías trabajan en conjunto para que los movimientos del cuerpo sean planeados, coordinados y ejecutados adecuadamente (36). Cuando la innervación dopaminérgica está intacta, la activación de los receptores D1 de las NEMs de la vía directa favorece su excitabilidad, mientras que la estimulación de los receptores D2 de las NEMs de la vía indirecta disminuye su excitabilidad, dando como resultado global una inhibición de los núcleos de salida (SNr y GPi) que favorece la ejecución de los movimientos voluntarios. Todo lo anterior se altera cuando se pierde la innervación

dopaminérgica, desencadenando las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Parkinson.

3.11 Función del circuito motor en la Enfermedad de Parkinson

En la enfermedad de Parkinson (EP) la pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la SNc causa una profunda depleción de dopamina en el cuerpo estriado, lo cual disminuye el efecto antagónico de los receptores D1 y D2 sobre los receptores A1 y A2A respectivamente, alterando la función y excitabilidad de las NEMs de ambas vías del circuito motor (34).

Como se observa en la Figura 9, en la EP se reduce la inhibición producida por la estimulación de los receptores D2 en las NEMs de la vía indirecta, lo que favorece la activación de los receptores A2A, incrementando la actividad de las neuronas del NST y produciendo una mayor excitación sobre la SNr y el GPi (34). Por otro lado, la ausencia de estimulación de los receptores D1 en las NEMs de la vía directa aumenta la activación de los receptores A1 lo que disminuye la excitabilidad de las NEMs y favorece la excitación de la SNr y el GPi (34) (ver Fig. 9). En conjunto, la sobreestimulación de los receptores de adenosina en ambas vías del circuito motor produce un aumento de la actividad de las neuronas GABAérgicas de los núcleos de salida (SNr/GPi), lo que se traduce en la inhibición del tálamo impidiendo la transmisión de la información hacia la corteza motora, evitando de este modo la generación de movimientos del cuerpo (34).

Con la finalidad de proponer posibles alternativas de tratamiento farmacológico que aminoren los síntomas de la EP, es fundamental conocer más a fondo los cambios funcionales adaptativos que experimentan los receptores de adenosina en el cuerpo estriado privado de su inervación dopaminérgica.

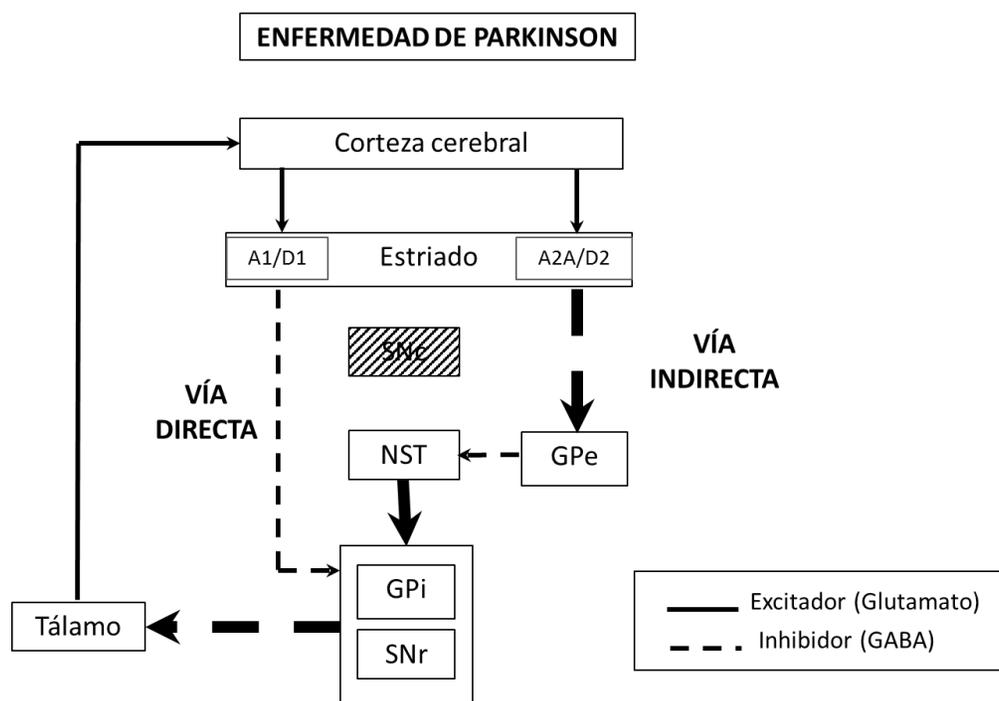


Figura 9. Circuito motor de los ganglios basales en la enfermedad de Parkinson.

SNc: sustancia nigra pars compacta; NST: núcleo subtalámico; GPe: globus pallidus externo; GPi: globus pallidus interno; SNr: sustancia nigra reticulata. (Modificado de la referencia 1 y 4)

3.12 Papel de los receptores A1 y A2A en la enfermedad de Parkinson

El tratamiento farmacológico para el manejo de los síntomas parkinsonianos incluye la levodopa, precursor de la dopamina y los agonistas dopaminérgicos (38, 39, 40). Aunque la levodopa presenta grandes beneficios en los pacientes con Parkinson, con el paso del tiempo la duración de estos efectos disminuyen, las respuestas al tratamiento son menos predecibles y pueden desarrollarse movimientos musculares involuntarios (discinesias) o distonía (espasmos involuntarios dolorosos en varias partes del cuerpo) (40). Por esta razón, ha surgido la necesidad de buscar fármacos con nuevos mecanismos de acción que puedan ser de gran utilidad para aminorar los síntomas de los pacientes (7, 39, 41). En este sentido, la regulación que ejerce la adenosina en la actividad de las NEMs de ambas vías del circuito motor ha fomentado la generación de

nuevas alternativas terapéuticas centradas en la modulación de la actividad de los receptores A1 y A2A (41, 42).

En modelos animales de la EP se ha observado que la utilización de antagonistas A2A revierten los síntomas motores sin la inducción o exacerbación de discinesias (41). Estos hallazgos han sido corroborados también en estudios realizados en humanos, encontrando que los antagonistas A2A mejoran modestamente los síntomas motores en pacientes con Parkinson en etapas avanzadas, sin incrementar los problemas de discinesias (40).

Sin embargo, la mayoría de los estudios que han evaluado la modulación de la transmisión corticoestriatal por la adenosina han sido efectuados en modelos animales con la inervación dopaminérgica intacta, lo cual impide el entendimiento preciso de la acción de la adenosina en el estriado en ausencia de dopamina, como es el caso de la EP (19, 28, 31). Por tal motivo, el abordaje experimental que puede ayudar a esclarecer la contribución de la adenosina en las alteraciones del circuito motor extrapiramidal en la EP es la utilización de modelos animales con denervación dopaminérgica en el estriado.

A continuación se presenta una síntesis de las evidencias encontradas sobre la función que tienen los receptores de adenosina A1 y A2A en la transmisión sináptica corticoestriatal del circuito motor extrapiramidal, tanto a nivel pre como postsináptico.

3.13 Evidencias morfológicas de la expresión de receptores A1 y A2A en botones sinápticos de la vía corticoestriatal.

La coexistencia de los receptores A1 y A2A en la terminal nerviosa de la vía corticoestriatal sugiere la presencia de un mecanismo regulador en la transmisión sináptica en donde los cambios en la concentración de adenosina modulan la liberación de glutamato en el estriado a través de la activación de estos receptores presentes a nivel presináptico, regulando de este modo la función de las NEMs en ambas vías del circuito motor (19).

Varios estudios han indicado que los receptores de adenosina A1 y A2A se co-localizan con los transportadores vesiculares de glutamato de tipo 1 y 2 (vGluT1 y vGluT2) en las terminales glutamatérgicas del cuerpo estriado de ratas, tanto en sinaptosomas (elementos pre y post-sinápticos) como en las terminales nerviosas (elemento presináptico) (19, 28, 31). De igual forma, en algunos estudios (28, 29) se ha encontrado que los receptores A2A se co-localizan en mayor proporción con los vGluT1, marcador selectivo de las terminales glutamatérgicas corticoestriatales; en contraste, una menor cantidad se co-localizan con los vGluT2, que solo se expresan en las terminales tálamoestriatales (28, 29).

De acuerdo con las evidencias anteriores, se puede concluir que los receptores A1 y A2A se expresan en las terminales corticoestriatales, sugiriendo que podrían estar implicados en la modulación de la liberación de glutamato y, en consecuencia, el control de la actividad motora voluntaria a través de la estimulación de las NEMs. Sin embargo, también es indispensable identificar la manera en la cual regulan la probabilidad de liberación de glutamato en condiciones normales y en ausencia de dopamina, como es el caso de la EP (1, 34).

3.14 Evidencia neuroquímica de modulación adenosinérgica de la transmisión sináptica corticoestriatal

En concordancia con las evidencias morfológicas que indican la co-localización de los receptores A1 y A2A en las terminales glutamatérgicas estriatales, algunos estudios han encontrado que la liberación de glutamato en sinaptosomas del estriado de ratas es modulada por ambos receptores en sentidos opuestos, dependiendo de la concentración de adenosina presente en el espacio sináptico. Cuando existe una baja concentración de adenosina (1 μM) se inhibe la secreción de glutamato, efecto mimetizado al agregar un agonista selectivo de los receptores A1 (19); por el contrario, cuando aumenta la concentración de adenosina (10-100 μM) se incrementa la liberación

del neurotransmisor, observándose el mismo efecto al agregar el agonista selectivo de receptores A2A, CGS 21680 (19). Se observó que la activación de los receptores A2A redujo la afinidad de la adenosina por los A1 (19). Estos resultados indican que los receptores A1 y A2A de las terminales corticoestriatales presentan diferentes niveles de afinidad por la adenosina, sugiriendo que ambos poseen una función antagónica en la regulación de la transmisión sináptica excitadora del estriado.

En otro estudio (29) se encontró que el agonista A2A (CGS21680) facilitó la liberación de glutamato en sinaptosomas del estriado de ratas cuyas NEMs no expresan los receptores A2A, mientras que el efecto estimulante del agonista A2A no ocurrió en sinaptosomas estriatales provenientes de ratas cuyas neuronas corticales carecen de los mismos receptores (29). La liberación de glutamato inducida por la activación de los receptores A2A fue inhibida por la administración de un fármaco antagonista A2A pero no con un antagonista de los receptores A1 (31). Estos resultados confirman que solo los receptores presinápticos A2A en las terminales glutamatérgicas que provienen de la corteza hacia el estriado están involucrados en el aumento de la liberación de glutamato que excita a las NEMs (29).

Las evidencias funcionales concuerdan con los hallazgos acerca de la co-localización de los receptores A1 y A2A en las terminales glutamatérgicas corticoestriatales, sugiriendo que ambos actúan como moduladores, ya sea favoreciendo o inhibiendo la liberación del glutamato en la hendidura sináptica, y por ende, podrían estar implicados en la regulación de la transmisión glutamatérgica del estriado (19, 28, 31).

3.15 Evidencias electrofisiológicas de modulación adenosinérgica de la transmisión sináptica corticoestriatal

La modulación ejercida por los receptores A1 y A2A sobre la transmisión glutamatérgica estriatal también ha sido evaluada midiendo la respuesta

electrofisiológica inducida en las NEMs registradas tras la estimulación de las terminales corticoestriatales en rebanadas del cuerpo estriado de ratas (43, 44). A continuación se presenta un resumen de estas evidencias.

3.15.1 Efecto de la adenosina

La aplicación de adenosina a concentraciones de 20 a 50 μM en rebanadas del estriado de ratas disminuye la liberación de glutamato produciendo una reducción del potencial postsináptico excitador (PPSE) y de las corrientes postsinápticas excitadoras (CPSEs), tanto en registros extracelulares como intracelulares (44, 45, 46). Con la finalidad de identificar el tipo de receptor de adenosina que produce esta acción, otros autores realizaron estos mismos experimentos en rebanadas del estriado de ratones manipulados genéticamente para que no se expresen los receptores A1, encontrando que concentraciones de adenosina de 30 a 100 μM no producían ninguna modificación en el PPSE ni en las CPSEs (47), corroborando que los receptores A1 son los responsables de producir la inhibición en la liberación del glutamato.

Como se mencionó con anterioridad, los receptores de adenosina se encuentran presentes tanto a nivel presináptico en la neurona corticoestriatal como a nivel postsináptico en las NEMs del estriado. Por tal motivo, se realizaron estudios para evaluar si la aplicación de adenosina producía un cambio en el cociente de pulso pareado, una técnica utilizada para identificar si el efecto de la aplicación de fármacos es a nivel pre o postsináptico. Esta técnica consiste en la aplicación de dos estímulos de la misma intensidad pero separados por un intervalo de tiempo, obteniendo dos componentes: S1, que es la primera corriente y el S2, la segunda corriente; el cambio en el cociente S2/S1 indica que la acción de los fármacos se produce a nivel presináptico (46, 47). De acuerdo a la teoría del calcio residual, un aumento en el cociente del pulso pareado indica una inhibición presináptica de la probabilidad de liberación del neurotransmisor, mientras que una disminución del cociente indica una facilitación presináptica (48). En los estudios realizados en rebanadas del estriado de ratas se

encontró que la aplicación de adenosina produce un incremento en el cociente de pulso pareado, así como una disminución en el potencial postsináptico excitador tanto en registros poblacionales como en registros intracelulares (43, 46, 47). Estos hallazgos sugieren que la adenosina presente en el espacio extracelular del estriado (20) produce una depresión de la transmisión sináptica corticoestriatal al inhibir la liberación del glutamato de las neuronas corticales que inervan a las NEMs (43, 46, 47); efecto realizado principalmente por la activación de los receptores de adenosina A1 (45, 46).

Las evidencias anteriores indican que la adenosina presente en la hendidura sináptica entre las neuronas de la corteza y las NEMs ejerce su acción a nivel presináptico inhibiendo la liberación de glutamato y, por ende, aumentando el PPSE y de las CPSEs dependiendo de la concentración existente en el espacio sináptico (43, 44, 45, 46, 47). Cabe recalcar que estos hallazgos se realizaron en animales con la inervación dopaminérgica intacta; y debido a que estos receptores de adenosina se co-localizan con los de dopamina, es importante conocer si la función de los receptores A1 y A2A se modifica cuando existe una depleción de la dopamina.

3.15.2 Efecto de los agonistas y antagonistas selectivos de los receptores A1

Para esclarecer la función de los receptores A1 en la transmisión sináptica corticoestriatal se han realizado estudios empleando agonistas y antagonistas selectivos de estos receptores en animales con la inervación dopaminérgica intacta (20, 44, 46).

Se ha observado que los agonistas de los receptores A1, como el R-PIA (1 μ M) y el CPA (0.5 μ M), inhiben los PPSE registrados en las NEMs del estriado al estimular las proyecciones tálamoestriatales (46) y corticoestriatales (44, 46). El R-PIA también inhibió el potencial de campo en forma dependiente de la concentración (0.5-5 μ M), efecto que perduró hasta 50 min durante el lavado (44). Estos resultados demuestran que tanto las proyecciones excitadoras procedentes del tálamo como de la corteza hacia

el estriado están sujetas a la modulación inhibitoria ejercida por la adenosina a través de la activación de los receptores A1.

La aplicación de antagonistas de los receptores A1 en rebanadas del estriado de ratas previene la inhibición del PPSE corticoestriatal causada por la adenosina y los agonistas A1, tanto en registros extracelulares (44, 46) como intracelulares (45, 46). De igual, los antagonistas de receptores A1, DPCPX (0.5-5 μ M) y 8-ciclopentil teofilina (1 μ M), producen por sí mismos un aumento en la amplitud del potencial de campo (20, 44, 46) y del PPSE registrado intracelularmente en las NEMs (45, 46), al estimular la vía corticoestriatal, indicando que en las rebanadas de estriado la adenosina endógena ejerce a nivel presináptico una acción inhibitoria tónica de la liberación de glutamato en esta vía.

3.15.3 Efecto de los agonistas y antagonistas selectivos de los receptores A2A

La acción de los receptores de adenosina tipo A2A es opuesta a la que presentan los receptores tipo A1; por lo cual se han realizado investigaciones acerca del efecto que producen los agonistas y antagonistas A2A en la transmisión corticoestriatal (28, 46, 49, 50).

En algunos estudios se ha reportado que la administración de agonistas de los receptores A2A en rebanadas del estriado de ratas con la inervación dopaminérgica intacta produce una ligera disminución en el PPSE (44), mientras que en otros estudios no se han reportado modificaciones en la amplitud de los PPSE ni en las CPSEs cuando se administran solos, tanto en registros poblacionales como intracelulares de las neuronas del estriado (44, 46). Solamente en un estudio (28) la administración del agonista de receptores A2A, CGS 21680, produjo un incremento en las CPSEs de las NEMs de la vía directa pero no en las de la vía indirecta.

En rebanadas de cerebro procedentes de ratas con la inervación dopaminérgica intacta la aplicación aislada de antagonistas de los receptores A2A no produce modificaciones en el PPSE y en las CPSEs, tanto en registros de potencial de campo como registros intracelulares (28, 49, 50, 51). Sin embargo, la co-aplicación de antagonistas A2A con un agonista de receptores D2 reduce tanto los PPSE como la frecuencia y amplitud de las CPSEs (49, 51). La utilización del protocolo de pulso pareado indicó que, en presencia de un agonista D2, el antagonista A2A aumentó la amplitud del componente S2, indicando que el efecto sinérgico para inhibir la liberación de glutamato ocurrió a nivel presináptico (49, 51).

Los receptores A2A presinápticos modulan a las vías aferentes corticoestriatales que hacen sinapsis con las NEMs de ambas vías del circuito motor. Esto se demostró en un estudio (28) en donde los antagonistas A2A disminuyeron la amplitud de las CPSEs de las NEMs de la vía directa, sin presentar ningún efecto en las NEMs de la vía indirecta, en presencia del antagonista GABAérgico picrotoxina (28). La administración de agonistas A2A, por el contrario, incrementó la amplitud de las CPSEs solamente en las neuronas de la vía directa (28). Otro estudio (52) corroboró lo anterior mostrando que los antagonistas A2A no modificaron los PPSE en las NEMs de la vía indirecta (52). En contraste, el bloqueo de los receptores A2A potenció la depresión de largo plazo en las NEMs de la vía indirecta, pero no el de la vía directa. Sin embargo los efectos inducidos en las NEMs de la vía indirecta al activar los receptores A2A presinápticos no se han estudiado en su totalidad, en donde posiblemente el bloqueo selectivo de estos receptores permita la estimulación de la actividad motora al evitar la liberación del glutamato sobre NEMs del estriado, y por ende mejore los síntomas de los pacientes con Parkinson (28, 52).

Todos las evidencias presentadas anteriormente se han obtenido en animales con la inervación dopaminérgica intacta, a excepción de un estudio (51) en donde se utilizaron rebanadas del estriado de ratas adultas con lesión de la vía dopaminérgica con 6-OHDA. Cuando se aplicaron simultáneamente antagonistas A2A y agonistas de los receptores D2 se observó una reducción en el PPSE y en las CPSEs. Estas evidencias

apoyan el planteamiento de una interacción antagónica funcional entre los receptores D2 y A2A que contribuye a la modulación de la transmisión sináptica en el circuito motor. De igual forma, estos hallazgos sugieren que la utilización en conjunto de antagonistas A2A y agonistas D2 podría contribuir a mejorar la transmisión sináptica en las neuronas corticoestriatales, favoreciendo la generación y control de los movimientos voluntarios que mejoren los síntomas de la EP (51).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La pérdida de las neuronas dopaminérgicas en la enfermedad de Parkinson produce una cascada de modificaciones funcionales de varios componentes de los ganglios basales, entre los que se encuentran un aumento de la expresión y posiblemente de la función de los receptores de dopamina (53) y adenosina (54), entre otros. Es probable que estos cambios homeostáticos contribuyan a la aparición de los signos y síntomas de la enfermedad, razón por la cual se han desarrollado diversos tratamientos farmacológicos (1, 39, 55), que tienen como propósito compensar estas alteraciones para restaurar la movilidad de los pacientes.

Entre las sustancias farmacológicas que han empezado a utilizarse para el tratamiento de la enfermedad se encuentran los antagonistas de los receptores A2A, ya que favorecen la acción de los receptores D2 mejorando las actividades motoras de los pacientes (49). Algunos estudios han indicado que la utilización en conjunto de los agonistas de los receptores D2 y los antagonistas de receptores A2A disminuye la frecuencia de potenciales postsinápticos excitatorios del estriado, posiblemente por la inhibición en la liberación de glutamato (39, 52). Esta acción en conjunto de los receptores sugiere un posible mecanismo postsináptico que posiblemente contribuiría a disminuir los síntomas parkinsonianos al evitar la sobreestimulación de las neuronas del estriado (52).

Sin embargo, también se ha documentado que la cafeína es capaz de mejorar la función motora en pacientes con enfermedad de Parkinson (9, 10, 11). El hecho de que la cafeína sea un antagonista no selectivo de los receptores de adenosina A1 y A2A (56), sugiere que el bloqueo de ambos receptores puede contribuir a la mejora de los síntomas parkinsonianos. Esta idea ha sido apoyada por la observación de que la mejoría de la función motora de ratas hemiparkinsonianas tratadas con dosis bajas de cafeína puede ser imitada administrando dosis equivalentes de un antagonista selectivo de los

receptores A2A de adenosina (ZM 2413859 o de un bloqueador selectivo de los receptores A1 (DPCPX) (57).

Para dilucidar los mecanismos por los cuales los receptores A1 y A2A modulan la función de los circuitos neuronales del cuerpo estriado se han realizado diversos estudios electrofisiológicos. Sin embargo, en su mayor parte estos trabajos se han realizado en animales con la inervación dopaminérgica intacta, enfocándose en el estudio de su acción a nivel postsináptico. Los resultados encontrados en estos estudios no representan la situación real de los pacientes con Parkinson, en quienes la depleción de dopamina genera cambios funcionales en diversos receptores, incluyendo los de dopamina y adenosina (55, 53, 54). Por esta razón, es importante realizar más estudios evaluando la acción a nivel presináptico de los agonistas y antagonistas de los receptores A1 y A2A sobre la transmisión excitadora corticoestriatal en modelos animales con depleción de dopamina, la cual simula mejor los cambios plásticos que ocurren en los receptores y sinapsis del estriado. Solo de esta forma podrá averiguarse si el bloqueo individual o combinado de los receptores A1 y A2A sería la combinación apropiada para lograr un mejor control de los síntomas de la enfermedad de Parkinson (1, 29, 55).

A raíz de los estudios previos acerca de la función de los receptores A1 y A2A, para fines de este proyecto planteamos la siguiente pregunta de investigación: ¿La ausencia de dopamina aumenta la activación de los receptores A1 y A2A para inhibir y facilitar, respectivamente, la estimulación en la transmisión glutamatérgica excitadora de la vía corticoestriatal? La respuesta a dicha pregunta contribuirá a tener mejor conocimiento de la función de la adenosina en la regulación de la transmisión sináptica de los ganglios basales cuando no está presente la dopamina, situación que se encuentra en los pacientes con Parkinson.

5. JUSTIFICACIÓN

Existen varios estudios que han investigado las modificaciones en la modulación del circuito motor que se producen en la enfermedad de Parkinson. Sin embargo, aún hacen falta estudios en donde se evalúen los posibles efectos benéficos de la aplicación de fármacos que activen o bloqueen a los receptores A1 puesto que no se conoce con claridad la modificación funcional de éstos tras la depleción de dopamina. De igual forma, debido a que existen evidencias de que los receptores A1 y A2A están presentes tanto en las terminales nerviosas corticoestriatales como en las NEMs del estriado, es importante conocer la función que ejercen estos receptores en el circuito motor extrapiramidal tanto a nivel pre como postsináptico (8, 19, 42).

La aparición de diversos efectos adversos como resultado de la terapia farmacológica antiparkinsoniana ha impulsado la búsqueda de alternativas que puedan utilizarse en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Recientes estudios preclínicos apoyan la estrategia de utilizar antagonistas de los receptores de adenosina, tanto A1 como A2A, como una potencial terapia no dopaminérgica para los pacientes con Parkinson (57). Esta alternativa puede contribuir la disminución de los síntomas de la enfermedad sin causar empeoramiento en la discinesia, uno de las mayores complicaciones por el uso del fármaco levodopa (58, 59).

Estudios realizados en ratas parkinsonianas han demostrado que el bloqueo de los receptores de adenosina A1 y A2A con cafeína produce un potencial mecanismo de protección contra la respuesta inflamatoria durante la destrucción de las neuronas dopaminérgicas, mejorando la actividad motora en etapas tempranas de la enfermedad o retrasando el progreso de la misma (60). Del mismo modo, se han realizado estudios con sustancias antagonistas de los receptores A2A encontrándose no sólo una inhibición de las fluctuaciones motoras ocasionadas por el uso prolongado de la levodopa sino también favorece la neurogeneración y la reducción de los cambios funcionales en las sinapsis y vías de señalización en las neuronas (60).

Es indispensable realizar el estudio de la función por separado de los receptores A1 y A2A en la transmisión sináptica, con la finalidad de determinar cuál de ellos tiene una acción más potente en esta transmisión. Los hallazgos encontrados podrían contribuir a disminuir el efecto excitador del glutamato que provoca la aparición de los síntomas parkinsonianos.

Por otro lado, gran parte de los estudios realizados con antagonistas de adenosina han sido realizados en animales que presentan la inervación dopaminérgica intacta, sistema que se observa disminuido en los pacientes con Parkinson y que puede traer como consecuencia cambios en la función de otros receptores. De igual manera, la mayoría de las investigaciones se han enfocado en la acción a nivel postsináptico de la adenosina; aunque algunos estudios han indicado que la modulación de este neurotransmisor también se realiza en la neurona presináptica. Por esta razón, el presente trabajo estará enfocado en investigar las modificaciones funcionales que sufren los receptores de adenosina tras la pérdida de dopamina y la forma en la cual esta sustancia regula la transmisión sináptica corticoestriatal a nivel de la neurona presináptica (19, 28, 31).

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Comparar la acción moduladora de los receptores de adenosina A1 y A2A sobre la transmisión glutamatérgica de la vía corticoestriatal, en presencia de dopamina y en un modelo animal con depleción de dopamina.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarizar el modelo de parkinsonismo inducido mediante la depleción de dopamina con un esquema subcrónico de reserpina, midiendo el curso temporal de: consumo de alimento y agua, cambio de peso corporal y catalepsia de los animales.
2. Evaluar el efecto de un agonista selectivo de los receptores A1 sobre la transmisión glutamatérgica de la vía corticoestriatal, en presencia de dopamina y en un modelo animal con depleción de dopamina.
3. Evaluar el efecto de un antagonista selectivo de los receptores A1 sobre la transmisión glutamatérgica de la vía corticoestriatal, en presencia de dopamina y en un modelo animal con depleción de dopamina.
4. Evaluar el efecto de un agonista selectivo de los receptores A2A sobre la transmisión glutamatérgica de la vía corticoestriatal, en presencia de dopamina y en un modelo animal con depleción de dopamina.
5. Evaluar el efecto de un antagonista selectivo de los receptores A2A sobre la transmisión glutamatérgica de la vía corticoestriatal, en presencia de dopamina y en un modelo animal con depleción de dopamina.

6.3 HIPÓTESIS

Hipótesis nula

La ausencia de dopamina en el estriado no modificará la actividad de los receptores de adenosina A1 y A2A en la modulación de la transmisión glutamatérgica excitadora de la vía corticoestriatal.

Hipótesis alternas

- Si los receptores de dopamina D1 y de adenosina A1 presentan funciones antagónicas en el estriado, y la activación de los receptores A1 en presencia de dopamina inhibe la transmisión glutamatérgica excitadora de la vía corticoestriatal; entonces, la depleción de dopamina intensificará la inhibición de la transmisión glutamatérgica producida por los receptores A1.

- Si los receptores de dopamina D2 y de adenosina A2A presentan funciones antagónicas en el estriado, y la activación de los receptores A2A en presencia de dopamina favorece la transmisión glutamatérgica excitadora de la vía corticoestriatal; entonces, la depleción de dopamina intensificará la facilitación de la transmisión glutamatérgica producida por los receptores A2A.

7. METODOLOGÍA

7.1 Animales

Se utilizaron 162 ratas Wistar machos (200-400 g) criados en el bioterio del Centro de Investigaciones Regionales “Hideyo Noguchi” de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY), con la aprobación del Comité de Bioética para la realización del proyecto de investigación, como se muestra en el Anexo 1. Los animales se mantuvieron en cajas de acrílico con un ciclo de luz/obscuridad de 12:12 h (luces encendidas a las 7 a.m.), a una temperatura de 24°C (\pm 2°C), con agua potable y alimentos para ratas (Laboratory Rodent Diet, LabDiet®) a libre demanda. A la mitad de los animales se les realizó un tratamiento farmacológico con reserpina para establecer síntomas motores similares a los presentados en los pacientes con Parkinson, para lo cual se siguieron los criterios establecidos en la *Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio* (National Research Council, USA, 1996) esto con la finalidad de evitar una manipulación inadecuada en el animal que pudiera provocarles sufrimientos innecesarios durante el estudio.

7.2 Modelo farmacológico de parkinsonismo causado por el agotamiento de la dopamina con reserpina.

Aunque el modelo ideal de la enfermedad de Parkinson es la lesión de la vía dopaminérgica nigroestriatal con 6-hidroxidopamina (6-OHDA), presenta el inconveniente de requerir cerca de 4 meses para obtener una rata hemiparkinsoniana. La depleción de dopamina en el estriado tras la lesión de la vía nigroestriatal con 6-OHDA produce cambios en la expresión de diversos receptores y neuropéptidos en las neuronas espinosas medianas. La acción de estos neuropéptidos es regulada en forma selectiva por los receptores de dopamina D1 y D2, que se co-expresan con la dinorfina y sustancia P en la vía directa y la encefalina en la vía indirecta, respectivamente. Se ha reportado que la lesión con 6-OHDA produce en el estriado un incremento en la expresión del ARNm

de la preproencefalina (PPE) y un decremento de la preprotaquinina (PPT), la sustancia P y la prodinorfina (pDYN) (61, 62, 63, 64). Aunado a la modificación de estos neuropéptidos, se observa un decremento en los autorreceptores D2 en las terminales dopaminérgicas, seguida de un incremento de los receptores D2 en las neuronas del estriado; así como un decremento de la densidad de los receptores D1 (61, 63, 64, 65).

Con la finalidad de reducir el tiempo para obtener rebanadas de estriado con los cambios adaptativos de mayor similitud a los observados después de la degeneración de las neuronas dopaminérgicas ocasionada con la toxina 6-OHDA, se decidió utilizar un modelo farmacológico con reserpina, una toxina que bloquea el transportador vesicular de monoaminas-2 (VMAT-2) (ver Fig. 10) y que administrada por vía sistémica en pocas horas produce una disminución en los depósitos vesiculares de catecolaminas, como la dopamina, noradrenalina y serotonina dentro de las vesículas de las terminales nerviosas (66, 67).

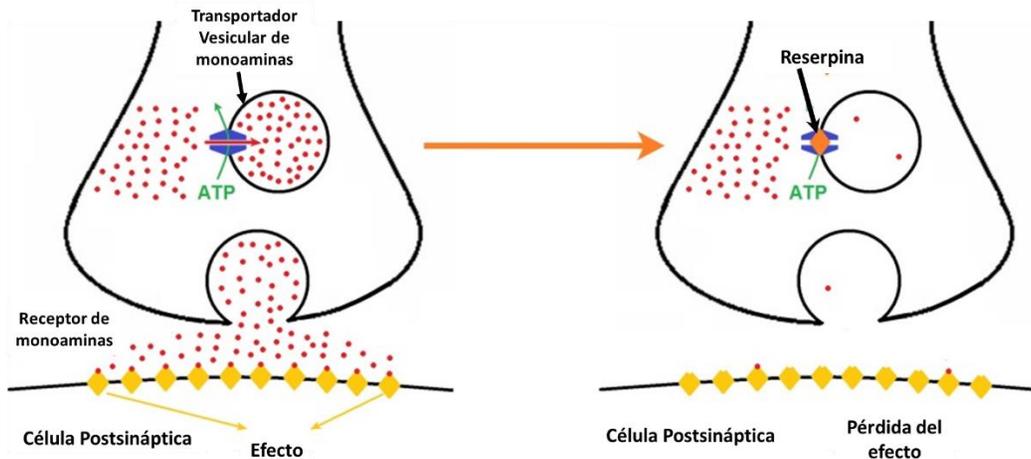


Figura 10. Efecto de la administración de reserpina en las terminales nerviosas. La administración sistémica de reserpina bloquea el almacenamiento de las catecolaminas en las vesículas sinápticas, evitando así su liberación hacia el espacio sináptico.

Diversos estudios han reportado los cambios en la expresión de neuropéptidos y receptores en el estriado posteriores a la administración de diferentes esquemas de tratamiento con reserpina. La aplicación de una dosis de reserpina de 5 mg/Kg en ratas produce una reducción de más del 95% de la dopamina estriatal en el intervalo de 3 a 48 horas a partir de su administración (68). Esta disminución en los niveles de dopamina modifica la expresión de diversas encefalinas, provocando un aumento en la expresión del ARNm de la preproencefalina (PPE) en el día 5 posteriores a la administración de 5 mg/Kg de reserpina, disminuye la preprotaquinina (PPT) pero no se produce ningún cambio en la expresión de la prodinorfina (pDYN) (64). La administración de una dosis menor de reserpina (2 mg/Kg) durante 2 días consecutivos produjo también un incremento de la PPE, del péptido contenedor de encefalina, de la metencefalina y las encefalinas de bajo peso molecular, en los días 3 y 5 posteriores a la inyección (69). Los resultados de estos estudios han llevado a proponer que la liberación tónica de dopamina reduce la síntesis de péptidos de encefalina en el estriado, produciéndose un aumento de las encefalinas tras la depleción de dopamina (69).

Con lo anterior, se demuestra que la depleción de dopamina con el tratamiento de reserpina reproduce en menor tiempo modificaciones similares a las observadas en la lesión con 6-OHDA: aumento de la expresión de PPE y encefalina, y disminución de PPT (64, 69).

Además de las modificaciones en los neuropéptidos, existe una modificación en la densidad de los receptores de dopamina con el tratamiento de reserpina. En el estudio realizado por Joyce et al. se observó un incremento en la densidad de los receptores D2 después de 14 días de tratamiento con una dosis de reserpina de 2.5 mg/Kg, administrada cada 2 días (65). De igual forma, el mismo efecto en los receptores D2 fue observado en un lapso menor (día 3 y 5 postinyección) en animales tratados con 2 dosis de reserpina (10 mg/Kg en el primer día y 5 mg/Kg en el segundo día) (70); una mayor densidad de los receptores D2 se observó en el día 22 de tratamiento de reserpina de 0.5 mg/kg diarios durante 21 días (70). El incremento en la expresión de los receptores D2

con los diferentes tratamientos de reserpina es similar al observado en la lesión con 6-OHDA, aunque cabe recalcar que los efectos se presentaron en un lapso menor con el tratamiento de reserpina.

Aunque algunos de los cambios homeostáticos causados por la reserpina en el estriado son semejantes a los causados por la lesión con 6-OHDA, existen algunas discrepancias. Así se ha observado que la lesión con 6-OHDA produce una disminución de la densidad de los receptores D1, mientras que el tratamiento con reserpina provoca un incremento (65). Esta diferencia se ha atribuido a que la destrucción de las aferentes dopaminérgicas con 6-OHDA elimina la influencia de algún factor trófico, lo cual no ocurre con el tratamiento con reserpina que solo vacía la dopamina vesicular (65). Otra diferencia importante es que la reserpina no solo reduce el almacenamiento de dopamina, sino que también disminuye el de noradrenalina y serotonina (67), lo cual puede afectar también el funcionamiento del circuito motor y que se deberá tomar en cuenta durante la interpretación de los resultados obtenidos en este trabajo.

Sin embargo, a pesar que el modelo de reserpina no reproduce con exactitud todos los procesos adaptativos que ocurren en el estriado tras la destrucción de las neuronas dopaminérgicas, sigue siendo un método válido que a corto plazo reproduce los cambios funcionales presentados en la enfermedad de Parkinson (67).

7.2.1 Propiedades físicoquímicas de la reserpina

La reserpina es un polvo cristalino blanco, prácticamente insoluble en agua y éter, ligeramente soluble en benceno y alcohol, y altamente soluble en cloroformo y en ácido acético (71). Dependiendo de las circunstancias, es sujeto de diferentes procesos de degradación como la isomerización, oxidación e hidrólisis. El principal producto de la degradación oxidativa de la reserpina debido a la luz y el calor es la 3-dehidroreserpina, una sustancia amarillenta-verdosa que modifica el color de la solución. Este proceso de degradación catalizada por la luz es un motivo de importancia para la

protección durante el almacenamiento y el control de la pureza de la reserpina. Además de la protección de la luz, las soluciones de reserpina se pueden estabilizar asegurando un pH óptimo en un rango de 3 a 4 y una atmósfera pobre de oxígeno, así como mediante la adición de agentes antioxidantes. El ácido ascórbico y los compuestos fenólicos son los más usados para este propósito (71).

Debido a que la reserpina presenta una baja solubilidad en el agua se utilizaron dos sustancias para disolverla; una de ellas es la hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) que es un oligosacárido cíclico constituido por unidades de glucopiranosas unidas por enlaces α -(1,4) (72). La configuración de los grupos hidroxilos de la ciclodextrina permite que el exterior de la molécula sea hidrofílico, permitiéndole disolverse en agua, y una cavidad hidrofóbica en su interior que proporciona un microambiente dentro del cual las moléculas no polares pueden alojarse para formar complejos de inclusión. Todos los derivados de la ciclodextrina presentan un cambio en el volumen de la cavidad hidrofóbica y en las propiedades de solubilidad, estabilidad ante la luz y el oxígeno, lo cual contribuye a preservar la actividad química de las moléculas capturadas (72). Comparada con otras sustancias que se suelen emplear para disolver la reserpina (dimetilsulfóxido, ácido acético, propilenglicol), la HP- β -CD presenta la enorme ventaja de ser prácticamente atóxica, pues su DL_{50} en la rata es mayor a 5000 mg/Kg tras su administración por vía oral, y entre 450 y 790 mg/Kg cuando se administra por vía intravenosa. También se ha reportado que la HP- β -CD es muy poco irritante tras la inyección intramuscular (72).

El ácido DL-láctico (Sigma) fue la otra sustancia utilizada para favorecer la disolución de la reserpina, la cual es una base débil que tiene mayor estabilidad en un pH ácido (71).

Con base en los estudios previos que reportan las dosis e intervalos de reserpina que inducen cambios adaptativos en la expresión de los receptores de dopamina D2 y los neuropéptidos encefalina y sustancia P en el estriado de las ratas, semejantes a los

causados por la 6-OHDA (64, 69), para inducir el síndrome parkinsoniano se eligió el siguiente esquema de tratamiento con reserpina que se representa en la Figura 11:

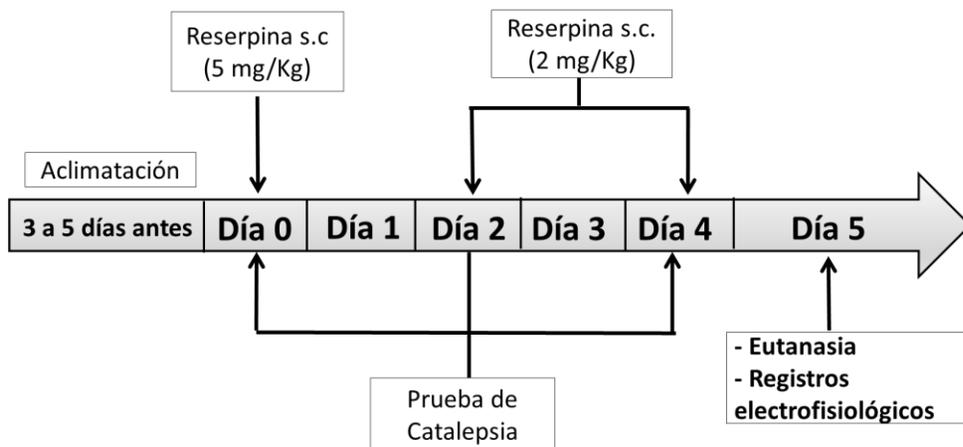


Figura 11. Esquema de tratamiento farmacológico con reserpina.

La vía de administración intraperitoneal fue sustituida por la vía subcutánea (s.c.) debido a que Halaris y Freedman (73) reportaron que cerca de un 5% de los animales tratados con 5 mg/Kg i.p. de reserpina no presentaban los síntomas característicos de la reserpinización (disminución de peso > 5%, depleción de serotonina > 83%) a las 24 horas postinyección. Sin embargo, cuando la misma dosis de reserpina era administrada por vía subcutánea ninguno de los animales mostró tolerancia a los efectos de la reserpina, presentando los síntomas de la reserpinización (73).

Todas las dosis de reserpina fueron administradas en un volumen de 1 ml/Kg. Para determinar las concentraciones adecuadas de HP- β -CD (Aldrich) y de DL-ácido láctico (Sigma-Aldrich) para disolver la reserpina (ICN Biomedicals Inc.) se realizaron diversas pruebas de solubilidad, encontrando que para disolver correctamente las dosis de 5 y 2 mg/Kg se requieren soluciones cuya composición se indica en la Tabla 1:

Tabla 1. Composición del vehículo para disolver la reserpina.

Sustancia	Para 5 mg/mL		Para 2 mg/mL	
	Cantidad	Concentración (mg/mL)	Cantidad	Concentración (mg/mL)
HP- β -CD	100 mg	10%	40 mg	4%
Ácido DL-ácido láctico	10 μ L	1%	4 μ L	0.4%
Agua desionizada	900 μ L	---	960 μ L	---

Se formaron dos grupos de animales, un grupo experimental al cual se le administró la solución con reserpina y un grupo control tratado únicamente con el vehículo de HP- β -CD con ácido láctico (1 mL/Kg). Ambos tratamientos fueron administrados por vía subcutánea, para lo cual se diseñó una trampa hecha con envase de plástico en donde se introducía al animal para inmovilizarlo, dejando expuesta la zona dorsal cercana al cuello a través de una ventana rectangular elaborada en la pared del envase, permitiendo la inyección del fármaco con mayor facilidad (ver Fig. 12).

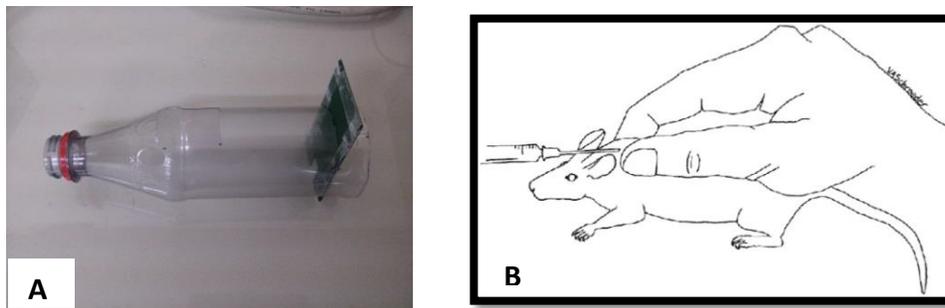


Figura 12. Inyección subcutánea.

A) Trampa utilizada para inmovilizar a la rata durante la inyección. B) Forma de administración de la inyección subcutánea.

7.3 Validación del esquema de reserpización mediante la prueba de catalepsia

Una de las limitaciones que presenta este trabajo es la dificultad de realizar las mediciones de los niveles de dopamina en el estriado tras la administración de reserpina, por lo cual se decidió realizar la evaluación de otras variables para determinar si el esquema de reserpización reproduce las modificaciones funcionales de las neuronas espinosas medianas que se presentan en la enfermedad de Parkinson. Las variables que se evaluaron para la validación del esquema de reserpización fueron: (a) el consumo de agua y alimento, (b) el cambio de peso corporal de los animales y (c) la acinesia y rigidez muscular.

Halaris y Freedman (73) reportaron que el síndrome de reserpización incluye la presencia de adipsia y afagia en los animales. Sin embargo, después de revisar la literatura, no encontramos estudios que describan el curso temporal del consumo de agua y alimento en los animales después de la administración de reserpina, razón por la cual se decidió cuantificar el curso temporal de dichas variables durante todo el tratamiento con reserpina. La medición del agua y alimento se realizó diariamente a partir del día anterior a la aplicación de la primera dosis de reserpina (día -1) hasta el día del sacrificio (día 5). El consumo de alimento se midió pesando diariamente la cantidad de alimento y del bebedero donde se le proporcionaba agua al animal, en el caso del agua se consideró que cada gramo pesado representaba 1 mL. El consumo diario de cada animal se obtuvo calculando la diferencia entre la cantidad de agua y alimento diario y la medición del día anterior, normalizándolo de acuerdo al peso corporal de cada animal para obtener la cantidad en gramos y mililitros consumidos por Kg de peso diario. El peso corporal de los animales también se midió diariamente a partir del previo a la primera inyección (día -1) hasta el día del sacrificio (día 5).

7.4 Alimentación intragástrica

El esquema de reserpización seleccionado provocó que en el día 5 de tratamiento las ratas experimentaran una pérdida de peso mayor del 30% con respecto al peso inicial (día -1), razón por la cual se decidió alimentar a los animales por vía intragástrica para mejorar la calidad de vida de los animales evitando la desnutrición y deshidratación provocada por la administración de reserpina. Nosotros esperábamos que esta alimentación intragástrica ayudaría a preservar en condiciones óptimas el funcionamiento cerebral, lo cual repercutiría favorablemente en las neuronas del estriado utilizadas para los experimentos y en consecuencia a mejorar la estabilidad de los registros electrofisiológicos y la confiabilidad durante la interpretación de los resultados. Adicionalmente, el análisis cuantitativo de estas variables permitiría descartar la posibilidad de que la rigidez muscular que presentan los animales sea provocada por la disminución en el consumo de agua y alimento.

Tomando en cuenta que el peso de los animales utilizados fue de 200 a 400 g y que la energía requerida es de 58 – 87 Kcal por día, el aporte energético seleccionado fue de 290 Kcal/Kg de peso corporal de la rata (74). La distribución de macronutrientes fue la siguiente: 21% de proteínas, 12% de lípidos y 67% de hidratos de carbono, obteniendo entre 3.5 y 4.3 Kcal/mL (75).

Debido a que por vía intragástrica el volumen máximo que puede ser administrado en cada toma es de 4 mL para una rata de 200 g, 5 mL para una de 300 g y 6 mL para una de 400 g, se administraron dos tomas de alimento por día: una en la mañana (de 9 a.m. a 11 a.m.) y otra en la tarde (de 3 a 5 p.m.) (76). Aunado al limitado volumen gástrico que se puede administrar en cada toma de alimento, la viscosidad de la fórmula administrada impidió proporcionarle una mayor densidad energética a los animales; por esta razón, con la administración de ambas tomas de alimento se logró cubrir cerca del 50% de los requerimientos diarios de los animales (130-145 Kcal/Kg).

La administración de la alimentación se realizó con una sonda de Látex para drenaje urinario, tipo Nélaton, de 40 cm de longitud y calibre 8 Fr. Para asegurar que la sonda fuese introducida hasta el estómago, la punta de ésta se colocó a un centímetro por debajo del extremo del esternón y con un plumón se hizo una marca a la altura de la boca del animal. La fórmula alimentaria preparada se incorporó en una jeringa, la cual fue sujeta y sellada a la sonda con ayuda de cinta adhesiva. Antes de realizar la administración, la sonda fue lubricada con aceite mineral para facilitar su introducción y evitar erosiones en el tracto digestivo del animal; posteriormente la sonda fue introducida hasta que la marca hecha con el plumón estuviera a la altura de la boca del animal, en seguida se procedió a inyectar lentamente la fórmula alimentaria como se muestra en la Figura 13.

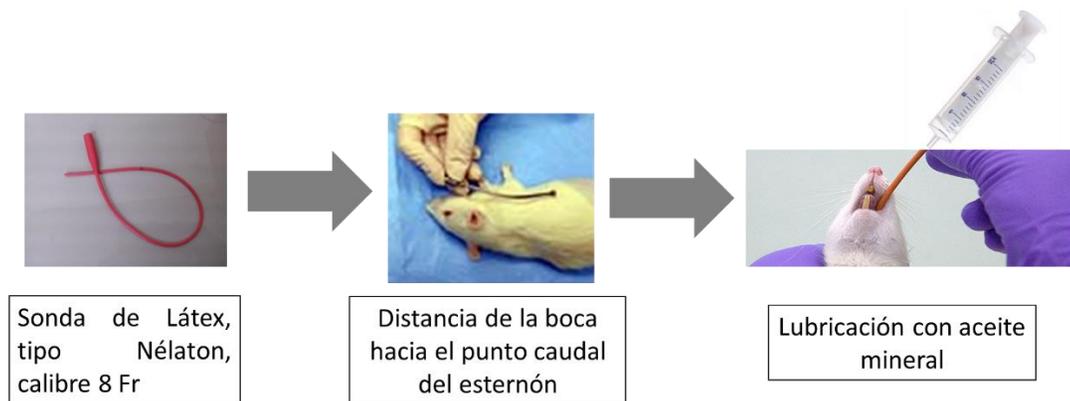


Figura 13. Administración de la alimentación intragástrica a los animales tratados con reserpina

Los ingredientes utilizados para la elaboración de la alimentación fueron los siguientes:

- Proteínas del Dr. Simi®.
- Fórmula para lactantes NIDAL Nestlé®.
- Jarabe sabor maple PROMESA®.

Tabla 2. Composición de la alimentación intragástrica

	<i>Cantidad</i>	<i>Energía (Kcal)</i>	<i>Proteínas (g)</i>	<i>Lípidos (g)</i>	<i>Hidratos de carbono (g)</i>
Primera toma	- 6.8 g Suplemento de proteína	22.1	3	0.22	3.76
	- 1.4 g Fórmula NIDAL	7.3	0.03	0.07	0.15
	- 2.8 ml Miel de Maple	10.4	0	0	2.6
	- 4.2 ml Agua	0	0	0	0
	Total	39.8	3.03	0.29	6.5
Segunda toma	- 6 g Fórmula NIDAL	31.2	0.1	0.31	0.67
	- 700 mg Suplemento de proteína	2.2	0.31	0.02	0.38
	- 0.8 ml Miel de maple	3.1	0	0	0.77
	- 4.215 ml Agua	0	0	0	0
	Total	36.5	0.41	0.33	1.82

7.5 Prueba de catalepsia

Para verificar que el esquema de tratamiento con reserpina hubiera causado alteraciones motoras compatibles con las del síndrome parkinsoniano, se midió la acinesia y rigidez muscular de los animales mediante la prueba de catalepsia en la barra fija, realizada en una caja de madera (23 cm de largo, 10.5 cm de ancho y 9 cm de altura) con una barra de metal horizontal localizada a 9 cm del suelo y a 4 cm de la parte posterior de la caja (58) (ver Fig. 14).

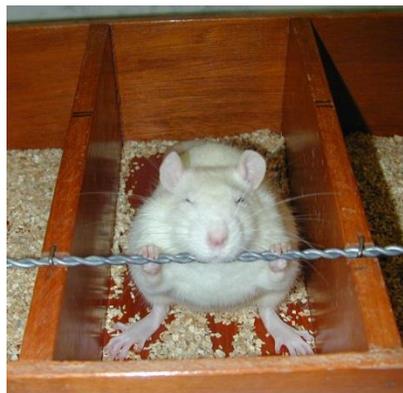


Figura 14. Rata en caja de catalepsia

Las pruebas se llevaron a cabo en un cuarto con aire acondicionado, a una temperatura de $23 \pm 1^\circ \text{C}$ y en el horario de 8:00 am a 2:00 pm, con un periodo de habituación antes de las pruebas, que consistió en mantener a la rata en la caja de madera durante 30 minutos para evitar situaciones de estrés y ansiedad. Para la realización de esta prueba la rata fue tomada del torso y levantada suavemente hasta que ambas patas delanteras se mantuvieron agarradas firmemente a la barra de metal, entonces el animal fue soltado y se cronometró el tiempo que tardaba en descender de la barra de metal; cuando ambas patas soltaban la barra metálica se detenía el cronómetro y se anotaba el tiempo registrado. El tiempo máximo que se permitió que la rata permaneciera agarrada a la barra fue de 300 s (5 min.); en caso de que no soltara la barra en ese lapso, fue bajada suavemente hasta la siguiente medición (77). En cada prueba de catalepsia, la medición del tiempo de descenso de la barra se realizó en 3 ocasiones con intervalos de 15 minutos entre cada una (minuto 0, 15 y 90), al final de cada prueba se sumaron los segundos obtenidos en las 3 mediciones, la sumatoria de estos tiempos se le definió como el área bajo la curva (ABC), variable que fue utilizada para determinar la presencia de rigidez muscular en las ratas (77).

Las pruebas de catalepsia se realizaron en la siguiente secuencia (ver Fig. 15):

- Día 0: antes de la primera inyección (vehículo o reserpina) para tener una medida que sirviera como la medición basal de cada rata, es decir, la ausencia del síndrome parkinsoniano; y luego a partir 90 minutos después de la inyección.
- Día 2 y 4: a partir de 90 minutos después de la inyección.
- Día 5: antes de los registros electrofisiológicos.

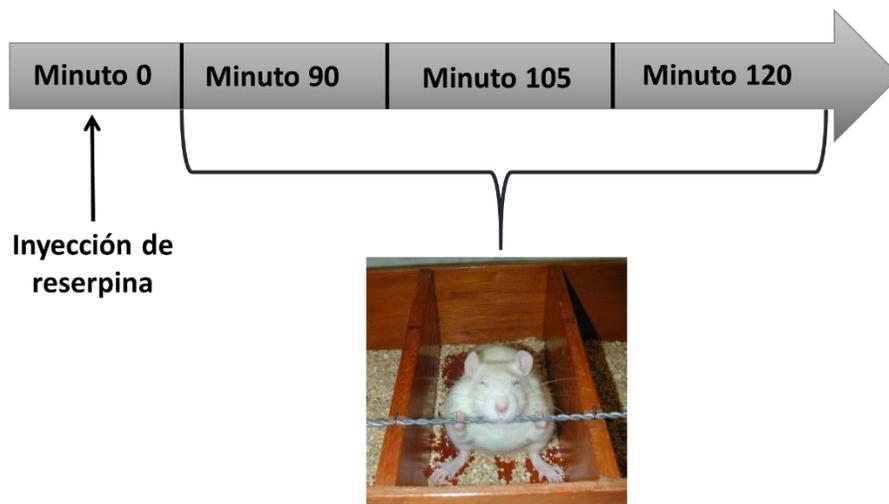


Figura 15. Estandarización de la prueba de catalepsia

Después de la estandarización del modelo farmacológico, el criterio utilizado para determinar si las ratas tratadas con reserpina eran aptas para la realización de los experimentos electrofisiológicos fue que en la prueba de catalepsia realizada en el día 4 de tratamiento (ver Fig. 11) las ratas obtuvieran un área bajo la curva mayor a 300 s (78).

7.6 Obtención de las rebanadas de cerebro

Las ratas seleccionadas para la realización de los registros electrofisiológicos fueron anestesiadas profundamente introduciéndolas en una cámara con isoflurano (1 mL) para luego perfundirlas por vía intracardíaca, como se muestra en la Figura 16, con una solución baja en sodio a 4°C con las concentraciones de sales indicadas en la Tabla 3. Estudios previos han demostrado que la sustitución del cloruro de sodio (NaCl) con sacarosa en la solución utilizada para la perfusión intracardíaca incrementa la supervivencia de las neuronas en las rebanadas obtenidas (79).

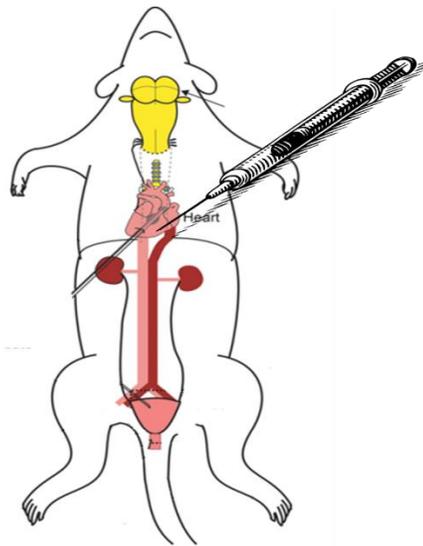


Figura 16. Perfusión intracardíaca con solución salina baja en sodio.

La rata se colocó boca arriba y se sujetaron las cuatro patas con cinta adhesiva. Se realizó una disección en la cavidad torácica hasta que el corazón fuera visible; se hizo un ligero corte en la aurícula derecha para que fluyera toda la sangre al exterior. Otro corte se realizó en el ventrículo izquierdo en donde se introdujo la aguja de una jeringa a través de la cual se dejó fluir 250 mL de la solución salina baja en sodio a 4°C.

Tabla 3. Composición de la solución salina baja en Sodio.

<i>Sustancia</i>	<i>Peso molecular (g/mol)</i>	<i>g/L</i>	<i>Concentración (mM)</i>
Sacarosa	342.3	86.25	252
KCl	74.55	0.26	3.5
NaHCO ₃	84.007	2.18	26
Glucosa	180.15	1.8	10
MgCl ₂ + 6H ₂ O	203.21	0.203	1
CaCl ₂ + 2H ₂ O	146.98	0.147	1

Seguidamente de la perfusión intracardíaca, se procedió a la decapitación del animal y a la extracción del cerebro para ser colocado en una solución salina isotónica baja en sodio a 4° C (Tabla 3) y se realizaron cortes coronales del cerebro con un grosor de 250 µm utilizando un VIBRATOME 1000 Plus® (The Vibratome Company, Estados Unidos). Una vez obtenidas las rebanadas se mantuvieron incubadas durante 60 minutos en la solución extracelular a temperatura ambiente, con las concentraciones de sales que se indican en la Tabla 4, constantemente burbujeadas con una mezcla de 95% O₂ y 5%

CO₂. Adicionalmente, a la solución extracelular donde estaban incubadas las rebanadas procedentes de las ratas tratadas con reserpina se le agregó α -metil-para-tirosina (AMPT, 30 μ M), un inhibidor de la enzima tirosina hidroxilasa, con la finalidad de garantizar que no existieran residuos de dopamina en las NEMs (80). Transcurrido el tiempo de incubación, las rebanadas fueron transportadas a una cámara de registro bañada con un flujo continuo de la solución extracelular (2 mL/min) oxigenada constantemente (81).

7.6.1 Preparación de las soluciones

Para los experimentos electrofisiológicos se usaron dos tipos de soluciones cuyos solutos tuvieron concentraciones similares a las del líquido extracelular (Tabla 4) e intracelular (Tabla 5) de las neuronas.

Tabla 4. Composición de la solución extracelular

<i>Cantidades para 1L</i>			
<i>Compuesto</i>	<i>Peso molecular (g/mol)</i>	<i>g/L</i>	<i>Concentración mM</i>
NaCl	58.44	7.305	125
KCl	74.55	0.26	3.5
NaHCO ₃	84.007	2.18	26
Glucosa	180.15	1.8	10
MgCl ₂ + 6H ₂ O	203.21	0.203	1
CaCl ₂ + 2H ₂ O	146.98	0.147	1

La solución extracelular fue preparada el mismo día de los experimentos electrofisiológicos a temperatura ambiente; mientras que la solución intracelular fue preparada y conservada en el congelador por un máximo de 30 días, después de lo cual se descartó y se preparó una nueva solución.

Tabla 5. Composición de la solución intracelular

<i>Cantidades para 20 mL</i>			
<i>Compuesto</i>	<i>Peso molecular (g/mol)</i>	<i>mg/20 mL</i>	<i>Concentración mM</i>
EGTA	380.4	76	9.98
MgCl ₂ + H ₂ O	203.21	4	0.98
HEPES	260.29	52.1	10
ATP	507.18	15.2	1.49
GTP	523.18	3.1	0.296
Fosfocreatina	255.1	102	19.99
Gluconato de potasio	234.24	18.7	3.99
KCl	74.55	22.4	15.02

7.7 Registros electrofisiológicos

Para la realización de los registros electrofisiológicos se utilizaron 2 pipetas de vidrio pulidas con una resistencia en el baño de 3 a 5 M Ω : una pipeta de estimulación y otra de registro. La pipeta de estimulación fue llenada con la solución extracelular y se colocó a 200 μ m de distancia de la neurona que se deseaba registrar; posteriormente a través de esta pipeta se envió un par de pulsos eléctricos con una duración de 180 μ s y una intensidad de magnitud variable (5 a 50 μ A). La pipeta de registro se llenó con la solución intracelular y fue utilizada para registrar los cambios en la amplitud de las corrientes sinápticas de una neurona en específico. Con la finalidad de registrar únicamente las corrientes sinápticas excitadoras glutamatérgicas, a la solución intracelular se le agregó picrotoxina, un antagonista de los receptores de GABA que elimina todas las corrientes inhibitorias, a una concentración de 1 mM. En algunos experimentos se usó bicuculina (otro antagonista GABA-A) a una concentración de 5 μ M en la solución extracelular.

La técnica utilizada para estos registros fue la de registro en célula completa (“Whole-cell patch-clamp”), cuyo principio básico consiste en colocar la punta de la pipeta de registro sobre la superficie de la membrana plasmática de la neurona, después de lo cual se le aplicó una ligera succión para crear un sello de alta resistencia en un

parche de membrana que fue fracturado con otra aspiración leve; de este modo la solución interna de la pipeta entra en contacto con el interior de la célula y a través de ella es posible registrar el flujo de las corrientes iónicas que atraviesan la membrana celular (ver Fig. 17).



Figura 17. Procedimiento de Whole-cell patch-clamp

Con esta técnica se obtuvieron las corrientes postsinápticas excitadoras (CPSEs), cuya amplitud fue medida a partir del descenso observado inmediatamente después de la aplicación del estímulo eléctrico hasta el pico máximo de la corriente; a esta medición se le denominó Amplitud S1 (ver Fig. 18). Con la finalidad de observar con mayor claridad el efecto de los fármacos sobre la amplitud de las CPSEs, el estímulo eléctrico (5 a 50 μA) aplicado a la rebanada de cerebro se fue regulando hasta que S1 alcanzó una amplitud entre 50 y 100 pA.

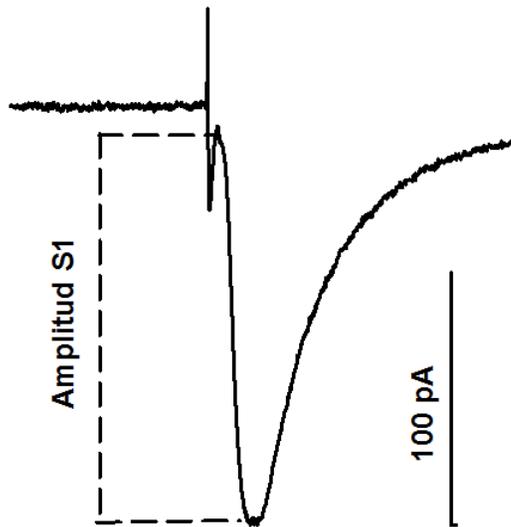


Figura 18. Medición de la corriente postsináptica excitadora (CPSE).

Para monitorear la estabilidad de los registros electrofisiológicos, a lo largo de cada experimento se aplicaron constantemente pulsos de voltaje de -2 mV, y solamente se aceptaron aquellos registros en donde la resistencia de entrada de la neurona tuvo una variación menor del 20%.

Durante la obtención de los registros electrofisiológicos se observó una variabilidad en las amplitudes de las CPSEs de las neuronas, la cual puede deberse a las variaciones de la distancia del electrodo de estimulación en relación con las fibras estimuladas. Por esta razón, para el análisis de los efectos farmacológicos, se decidió normalizar los datos de las CPSEs tomando como referencia (100 %) el promedio de las amplitudes de corriente de las CPSEs registradas durante los últimos 5 minutos de la condición basal de los registros antes de la aplicación de los fármacos. Posteriormente se calculó el cociente de la amplitud de las corrientes sinápticas S1 registradas durante todo el experimento divididas entre el promedio de la condición basal, dando como resultado la amplitud normalizada de las CPSEs (82).

Los registros intracelulares en la configuración de “célula completa”, en la modalidad de fijación de voltaje a -60 mV, se realizaron mediante un amplificador

(Multiclamp 700B). Los registros obtenidos se digitalizaron y almacenaron en un disco duro de computadora utilizando una interface analógica/digital Digidata 1440 (Axon Instruments) con una frecuencia de adquisición a 10 KHz (programa Clampex). Todos los cambios en la amplitud de las corrientes sinápticas registradas por la pipeta de vidrio fueron amplificadas y transferidos al Software AxoClamp para su posterior análisis estadístico (83).

7.8 Protocolo de pulso pareado

Para evaluar si los cambios en la probabilidad de liberación del neurotransmisor glutamato se dan a nivel presináptico o postsináptico tras la aplicación de los fármacos, se utilizó el protocolo del pulso pareado. Este procedimiento consiste en aplicar, a través de la pipeta de estimulación, un par de estímulos de igual intensidad y una duración de 180 μ s, separados por un intervalo de 50 ms, aplicando cada par a una frecuencia de 0.1 Hz (1 par de pulsos cada 10 seg). Con este procedimiento se obtuvieron 2 corrientes postsinápticas excitadoras (CPSEs) necesarias para el cálculo del cociente del pulso pareado (CPP), que se obtiene considerando ambas corrientes: a la primera CPSE se le conoce como condicionante (S1) y a la segunda CPSE como condicionada (S2) (ver Fig. 19). Las modificaciones en este cociente indican cambios en la probabilidad de liberación del neurotransmisor de las terminales nerviosas que tienen contacto con la neurona registrada (81).

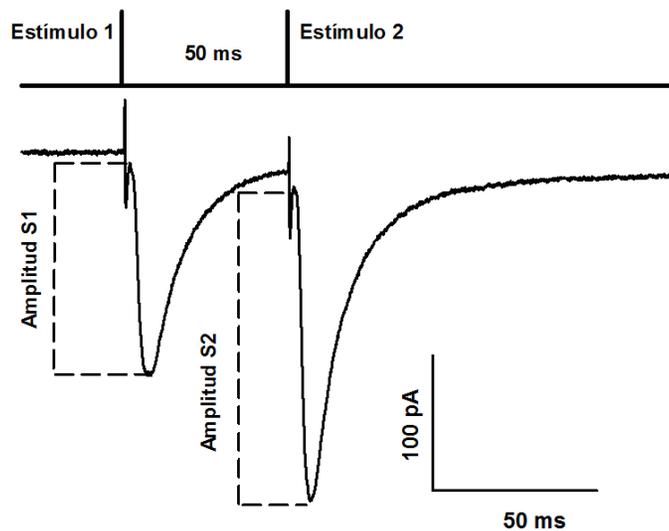


Figura 19. Técnica del Protocolo de pulso pareado

La fórmula utilizada para el cálculo del cociente del pulso pareado fue la siguiente:

$$CPP = S2/S1$$

Siendo S2 la amplitud máxima de la segunda CPSE, y S1 la amplitud de la primera CPSE.

7.9 Fármacos

Una vez formado el parche en la membrana celular, en la solución extracelular que fluye constantemente en la cámara de registro se agregaron diferentes concentraciones de cada fármaco (ver Tabla 6) y se registraron los cambios producidos en la amplitud de las CPSEs de la neurona registrada y en el CPP. Sin embargo, debido a que los fármacos que se utilizaron son insolubles en agua se utilizó el dimetilsulfóxido (DMSO) como sustancia para disolver los fármacos antes de aplicarlos en la solución extracelular durante los registros electrofisiológicos, a una concentración máxima de 0.6%, la cual no afecta la amplitud de las corrientes sinápticas (84). En la siguiente tabla

se presentan los fármacos y las concentraciones utilizadas para la realización de los registros electrofisiológicos.

Tabla 6. Tabla de fármacos utilizados en los experimentos.

<i>Nombre del fármaco</i>	<i>Concentración a utilizar</i>	<i>Función</i>	<i>Características</i>
CCPA (2-chloro-N ⁶ -cyclopentyladenosine)	300 nM.	Agonista selectivo A1	- Presenta alta afinidad (K _i = 0.4 nM) y cerca de 10,000 veces más selectividad para los receptores A1 que para los A2A (85). - Solubilidad*: Metanol: 19 mg/mL
DPCPX (8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine)	100 nM	Antagonista selectivo A1	- Tiene alta afinidad (K _i = 0.6 nM) y cerca de 740 veces más selectividad para los receptores A1 que los A2A en el estriado de ratas (86). - Solubilidad*: Insoluble en agua. DMSO: >4 mg/mL.
CGS 21680 (4-[2-[[6-amino-9-(N-ethyl-b-D-ribofuranuronamidoyl)-9H-purin-2-yl]amino]ethyl]benzene propanoic acid)	5 μM	Agonista selectivo A2A	- Presenta alta afinidad (K _i = 13.2 nM) y cerca de 211 veces más selectividad para los receptores A2A que para los A1 (87, 88). - Solubilidad*: Agua: <1 mg/mL a 25° C. DMSO: > 10 mg/mL
ZM 241385 (4-(2-[7-amino-2-(2-furyl)[1,2,4]triazolo[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ylamino]ethyl)phenol)	300 nM	Antagonista selectivo A2A	- Tiene alta afinidad (K _i = 0.7 nM) y cerca de 382 veces más selectividad para los receptores A2A en el estriado de las ratas (86). - Solubilidad*: DMSO: > 15 mg/mL.

* Datos de solubilidad reportados en la hoja técnica de proveedor.

7.10 Análisis estadístico

Se utilizaron diversas pruebas estadísticas para el análisis de los resultados obtenidos durante los registros electrofisiológicos. Se aplicaron las pruebas de Shapiro-Wilk para verificar la normalidad y la prueba de Levene para verificar la igualdad de varianzas; cuando los datos no cumplieron con estos supuestos estadísticos se utilizaron pruebas estadísticas no paramétricas para evaluar el efecto de los fármacos. Para analizar los cambios en el consumo de agua y alimento, del peso corporal, de la catalepsia y de la amplitud de las corrientes sinápticas glutamatérgicas a lo largo del tiempo se empleó un ANOVA de medidas repetidas de dos factores: tiempo (días de tratamiento) y tratamiento (reserpina y vehículo), con la prueba post hoc de Bonferroni. Los valores de consumo de agua y alimento, del peso corporal y del tiempo de descenso de la barra metálica de la catalepsia se reportan como la media \pm desviación estándar. Para evaluar el efecto de los fármacos sobre la amplitud de la corriente y en el cociente de pulso pareado, antes y después de la aplicación de los agonistas A1 y A2A, se utilizó la prueba no paramétrica de rangos signados de Wilcoxon de una cola. La prueba *t* de Student no pareada con la corrección de Welch se usó para comparar el cambio porcentual de los agonistas en las CPSEs y en el CPP entre el grupo de ratas tratadas con Vehículo y Reserpina. Los valores de amplitud de las CPSEs normalizadas y absolutas; así como del CPP se reportan como la media \pm error estándar. Todas estas pruebas estadísticas fueron procesadas con el software estadístico Prisma 5 para versión Windows 7 (89).

8. RESULTADOS

8.1 Estandarización y validación del modelo de parkinsonismo inducido con reserpina.

Las pruebas de estandarización del modelo farmacológico de reserpina se aplicaron en tres grupos diferentes: (1) Vehículo, tratado con la HP- β -CD, (2) Reserpina, sin alimentación forzada, y (3) Reserpina + alimentación intragástrica.

8.1.1 Efecto de la reserpina sobre el consumo de agua y alimento.

En la Figura 20 se observan los resultados obtenidos en las mediciones del consumo de agua y alimento. En las ratas no reserpinizadas (vehículo), 24 horas después de la primera inyección de la solución de HP- β -CD, la ingesta promedio de agua fue de 169.4 ± 19.1 mL/Kg/día y la de alimento de 103.7 ± 9.6 g/Kg/día, mientras que en el día 5 la ingesta de agua fue de 150.4 ± 10.1 mL/Kg/día y de alimento de 67.6 ± 14.7 g/Kg/día. Los animales tratados con reserpina mostraron adipsia y anorexia, observándose una disminución en el consumo de agua y alimento a las 24 horas después de la primera inyección. Así, el grupo Reserpina tuvo una ingesta promedio de agua de 11 ± 2.1 mL/Kg/día y de alimento de 1.1 ± 0.7 g/Kg/día, mientras que en el grupo Reserpina + ingesta, el promedio de consumo de agua fue de 33.3 ± 6.8 mL/Kg/día y de alimento de 5.1 ± 3.2 g/Kg/día. La adipsia y la anorexia perduró en ambos grupos tratados con reserpina, observándose que en el día 5 las ratas del grupo Reserpina tuvieron un consumo de agua en promedio de 39.7 ± 19.4 mL/Kg/día y de alimento de 4.7 ± 1.1 g/Kg/día; mientras que en el grupo Reserpina + ingesta el promedio de consumo de agua fue de 22.3 ± 6.3 mL/Kg/día y de alimento de 1.4 ± 0.4 g/Kg/día (ver Fig. 20, A y B).

El ANOVA de medidas repetidas de dos factores demostró que existe efecto significativo del factor tiempo ($F_{5,60} = 32.9, p < 0.0001$), del factor tratamiento ($F_{2,12} = 135.1, p < 0.0001$), así como de la interacción entre ambos factores ($F_{10,60} = 9.1, p < 0.0001$) en el consumo de alimento comparando los tres grupos de animales (Vehículo, Reserpina y Reserpina + ingesta). La media del consumo de alimento en el grupo Vehículo (no reserpinizado) fue significativamente mayor que los valores reportados en los grupos Res y Res + ingesta a partir del día 1 ($p < 0.001$, prueba post hoc de Bonferroni), no hubo diferencia de las medias entre el grupo Reserpina y Reserpina + ingesta. En el consumo de agua de los tres grupos de animales, el ANOVA de medidas repetidas de dos factores indicó que existen efectos significativos del factor de tiempo ($F_{5,60} = 23.0, p < 0.0001$), del factor tratamiento ($F_{2,12} = 46.4, p < 0.0001$) y de la interacción de ambos factores ($F_{10,60} = 8.8, p < 0.0001$). Las medias de consumo de agua del grupo Veh fueron significativamente mayores que las de los grupos Reserpina y Reserpina + ingesta a partir del día 1 posterior a la primera inyección ($p < 0.01$, prueba post hoc de Bonferroni), las medias de éstos últimos grupos no difieren entre sí.

Como se puede observar, no hubo diferencia significativa en el consumo de agua y alimento entre el grupo Reserpina y Reserpina + ingesta a lo largo de los 5 días de tratamiento, indicando que la administración de alimento por vía intragástrica no modificaron estas variables conductuales.

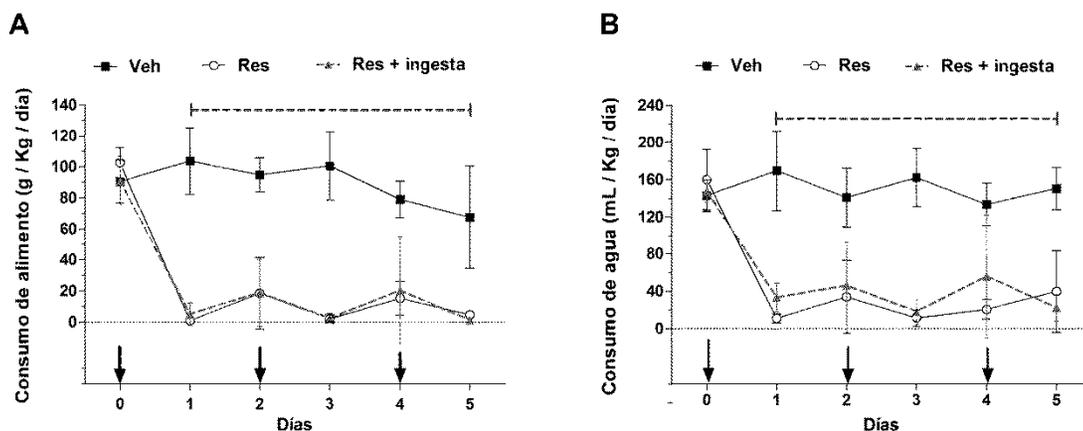


Figura 20. Efecto del tratamiento con reserpina en el consumo de agua y alimento. En ambas gráficas las flechas indican la administración vía s.c. del vehículo (Veh, 1 mL/Kg) o de la reserpina (Res, 5 mg/Kg en el día 0 y 2 mg/Kg en los días 2 y 4). Cada punto representa la media \pm desviación estándar de 5 animales por grupo. **(A)** Consumo diario de alimento normalizado al peso corporal de los animales (g/Kg/día). **(B)** Consumo diario de agua normalizado al peso corporal de los animales (mL/Kg/día). En ambas gráficas, la línea horizontal gris discontinua señala que, a partir del día 1, las medias de consumo de alimento y agua del grupo Veh difieren significativamente en comparación con el grupo Res y Res + ingesta.

8.1.2 Efecto de la reserpina sobre el peso corporal.

En la Figura 21 se observan los resultados obtenidos en las mediciones del peso corporal de las ratas. El ANOVA de medidas repetidas de dos factores indicó un efecto significativo del factor tiempo ($F_{5,60} = 101.9, p < 0.0001$), del factor tratamiento ($F_{2,12} = 130.4, p < 0.0001$), así como la interacción entre ambos factores ($F_{10,60} = 57.4, p < 0.0001$) en el cambio de peso a lo largo del tratamiento en los tres grupos de animales. Los cambios porcentuales en el peso reportados en el grupo Reserpina y en el grupo Reserpina + ingesta fueron significativamente mayores que los cambios encontrados en el grupo Vehículo ($p < 0.01$, prueba de Bonferroni) a partir del día 1 de tratamiento, diferencia que se mantiene hasta el día 5 (ver Fig. 21). Por otro lado, la administración de la alimentación intragástrica atenuó en forma significativa la disminución de peso a partir del día 3 de tratamiento con reserpina ($p < 0.05$, prueba de Bonferroni), encontrándose que al quinto día de tratamiento las ratas del grupo Reserpina + ingesta presentan 11.4 puntos porcentuales menos de disminución de peso en comparación con

el grupo Reserpina (ver Fig. 21). Estos resultados demuestran que la alimentación intragástrica evita que la disminución de peso de los animales exceda el 22%, permitiendo una mayor supervivencia y mejores condiciones de salud de los animales.

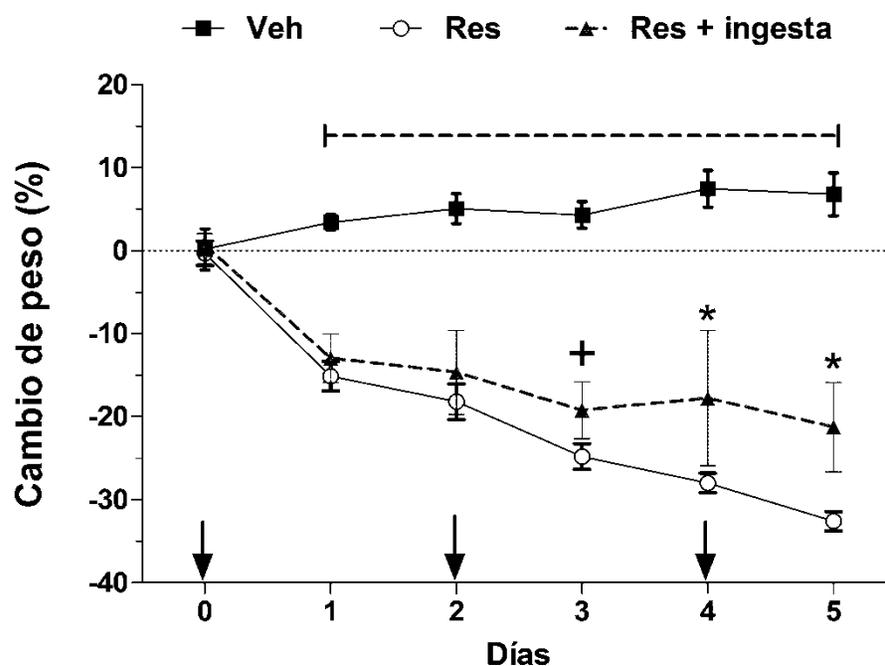


Figura 21. Efecto del tratamiento con reserpina en el peso corporal.

Las flechas indican la administración vía s.c. del vehículo (Veh, 1 mL/kg) o de la reserpina (Res, 5 mg/Kg en el día 0 y 2 mg/Kg en los días 2 y 4). Cada punto representa la media \pm desviación estándar de 5 animales por grupo. Los porcentajes del cambio de peso corporal se calcularon en base al peso de cada rata en el día previo a la primera dosis (Día -1). Veh = 288.5 ± 25.2 g; Res = 285.8 ± 42.5 g; Res + ingesta = 270.4 ± 21.24 g. La línea horizontal gris discontinua señala que, a partir del día 1, las medias de peso corporal del grupo Veh difieren significativamente en comparación con el grupo Res y Res + ingesta ($p < 0.01$, prueba de Bonferroni). A partir del día 3, las medias de los grupos Res y Res + ingesta difieren significativamente entre sí: +, $p < 0.05$; *, $p < 0.01$, (prueba de Bonferroni).

8.1.3 Efecto de la reserpina sobre la prueba de catalepsia.

En la Figura 22 se observan los resultados obtenidos en las mediciones de catalepsia en la prueba de la barra. Las mediciones realizadas a partir de los 90 minutos posteriores a la primera inyección (reserpina o HP- β -CD) en el día 0 mostraron que las ratas del grupo de Reserpina (197.9 ± 175.7 s, n=5) y Reserpina + ingesta (290.9 ± 110.8 s, n=5) permanecieron más tiempo asidas a la barra metálica en comparación con el grupo Vehículo (1.6 ± 0.2 s, n=5). El tiempo de descenso de la barra metálica en ambos grupos con reserpina se mantuvo hasta el quinto día de tratamiento: Reserpina (294 ± 98.2 s); Reserpina + ingesta (250.4 ± 50.2 s); mientras que en el grupo Vehículo no hubo inmovilidad (7.2 ± 2.6 s).

El ANOVA de medidas repetidas de dos factores demostró un efecto significativo del factor tiempo ($F_{4,48} = 35.7$, $p < 0.0001$), del factor tratamiento ($F_{2,12} = 94.3$, $p < 0.0001$), así como la interacción entre ambos factores ($F_{8,48} = 7.0$, $p < 0.0001$) en la comparación de la latencia al descenso de la barra metálica entre los tres grupos de animales. Las medias del grupo Vehículo (no reserpinizado) fueron significativamente menores en comparación con los valores de los grupos Reserpina y Reserpina + ingesta 0 ($p < 0.01$, prueba de Bonferroni) a partir de los 90 minutos de la inyección. No se encontró diferencia significativa en la latencia de descenso entre el grupo Reserpina y Reserpina + ingesta, indicando que la administración de la alimentación intragástrica no repercute en la manifestación de catalepsia inducida con reserpina; sugiriendo que la inmovilidad de los animales probablemente es producida por la depleción de la dopamina y no por la desnutrición aguda debida a la adipsia y la anorexia.

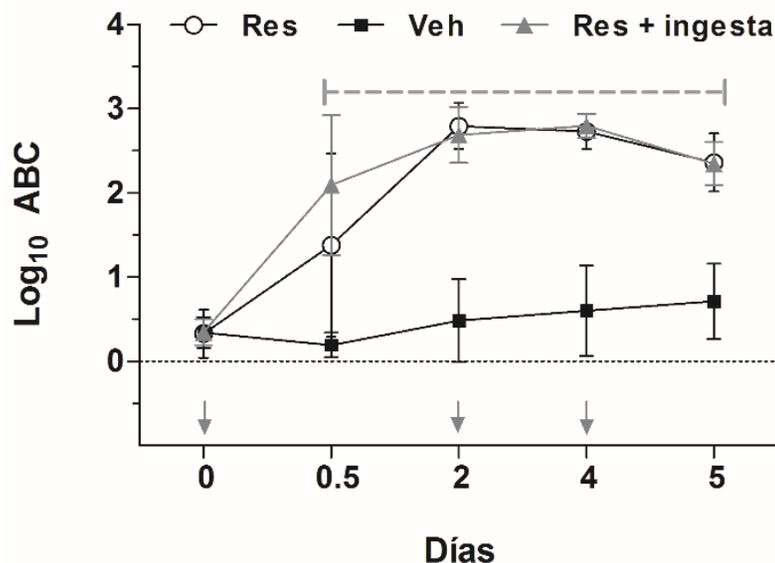


Figura 22. Efecto del tratamiento con reserpina sobre la prueba de catalepsia.

Las flechas grises indican la administración vía s.c. del vehículo (Veh, 1 mL/kg) o de la reserpina (Res, 5 mg/Kg en el día 0 y 2 mg/Kg en los días 2 y 4). Cada punto representa la media \pm desviación estándar. La intensidad de la catalepsia se representa en el eje de las ordenadas como el logaritmo en base 10 del área bajo la curva (ABC) del tiempo de descenso de la barra metálica. Los valores en el tiempo 0 representan la medición antes de la primera dosis y los valores en el tiempo 0.5 se refieren a la prueba realizada 90 min después de la primera inyección. La línea horizontal gris discontinua señala que las medias del grupo Veh difieren significativamente en comparación con los grupos Reserpina y Reserpina + ingesta ($p < 0.01$, prueba de Bonferroni).

8.2 Efecto de la depleción de dopamina sobre la modulación de la transmisión excitadora corticoestriatal mediada por los receptores de adenosina de tipo A1 y A2A.

Después de efectuar la estandarización del esquema de reserpina se procedió a realizar los registros electrofisiológicos en las NEMs de ratas tratadas con vehículo (no reserpinizadas) y con reserpina con la finalidad de evaluar el efecto de fármacos agonistas y antagonistas de los receptores de adenosina A1 y A2A sobre la amplitud de las corrientes sinápticas glutamatérgicas; así como determinar si el efecto es a nivel presináptico o postsináptico.

En la tabla 7 se presentan las características de las ratas utilizadas en los registros electrofisiológicos; como se puede observar, todas las ratas del grupo Reserpina presentaron una disminución del peso al día 5 del tratamiento cercano al 20 % tomando como referencia el peso del día previo a la primera inyección, mientras que las ratas no reserpinizadas presentaron un aumento en el mismo; estos resultados son similares a los observados durante la estandarización del esquema farmacológico con reserpina.

Tabla 7. Características de los animales utilizados para los registros electrofisiológicos.

Tratamiento	Grupo	No. de animales	Peso corporal (g)			Tiempo de descenso en la barra metálica (s)	
			Día -1	Día 5	% cambio	Día 0	Día 4
Agonista A1 (CCPA)	Veh	6	391.6 ± 37	405.1 ± 38.8	3.4 ± 1.7	23.5 ± 50.7	4.4 ± 3.3
	Res	5	381.8 ± 54.1	305.2 ± 43.9	-20.1 ± 2.7	2.7 ± 2.3	751.1 ± 150.2
Agonista A2A (CGS 21680)	Veh	4	341.6 ± 26.8	358 ± 25.6	4.8 ± 2.1	13.7 ± 11.5	5.1 ± 2.6
	Res	4	334.2 ± 55.4	271.9 ± 39.2	-18.4 ± 2.9	1.7 ± 0.9	672. ± 182.8
Agonista y antagonista A1 (DPCPX + CCPA)	Veh	2	388.8 *	395.9 *	2.4 *	2.7 *	2.2 *
	Res	2	450.3 *	350.8 *	-22.1 *	33.2 *	488.5 *
Agonista y antagonista A2A (ZM 241385 + CGS 21680)	Veh	2	341.8 *	356.4 *	4.3 *	1.8 *	6.9 *
	Res	4	363 ± 52.1	293.1 ± 47.8	-19.4 ± 2	2.2 ± 1.3	761 ± 252.1

Valores promedio ± desviación estándar. * Se presenta únicamente la media de los pesos y los tiempos de descenso de la barra metálica debido a que se obtuvieron solamente 2 animales.

Como se muestra en la Figura 23, los tiempos de descenso de la barra metálica obtenidos en el día 4 de tratamiento de las ratas tratadas con reserpina fueron significativamente mayores en comparación con los valores de las ratas no reserpinizadas (Vehículo), utilizadas para los registros electrofisiológicos con el agonista A1, CCPA ($p= 0.004$; prueba U de Mann-Whitney de dos colas; Fig. 23 A) y con el

agonista A2A, CGS 21680 ($p= 0.028$; prueba U de Mann-Whitney de dos colas; Fig. 23 B). Por otro lado, para los registros electrofisiológicos con los antagonistas de los receptores A1 (Fig. 23 C) y A2A (Fig. 23 D) solamente se utilizaron 2 ratas por grupo (reserpinizado y no reserpinizado), por lo cual no fue posible aplicar la prueba estadística (U de Mann-Whitney) para evaluar si la diferencia en el tiempo de descenso de la barra era significativa. Sin embargo, como puede observarse en la tabla 7 y en la Fig. 23 C y D, las ratas resepinizadas tuvieron en promedio un tiempo de descenso mayor al criterio establecido (300 s), mientras que en el grupo no reserpinizado no excedieron más de 10 s en la prueba de catalepsia.

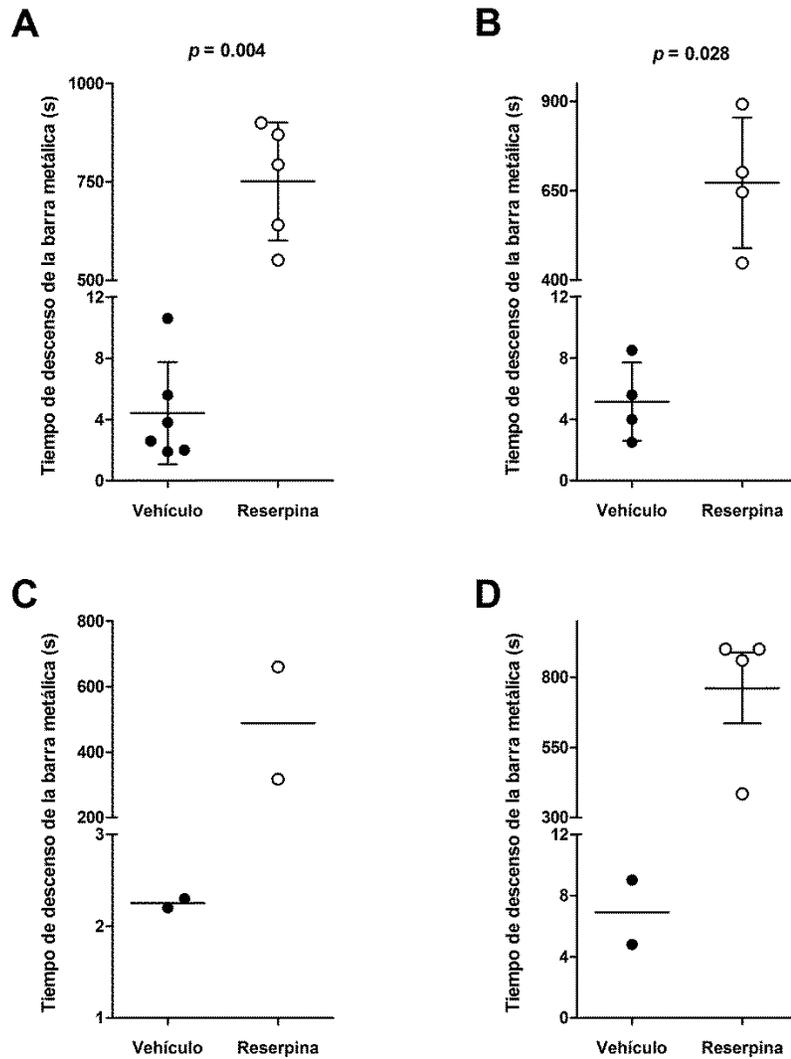


Figura 23. Tiempo de descenso de la barra metálica (s) obtenido en el día 4 de tratamiento en las ratas reserpinizadas y no reserpinizadas.

Se muestran las medias \pm desviación estándar del tiempo de descenso de la barra metálica (s) realizado en el día 4 de tratamiento en las ratas reserpinizadas y no reserpinizadas utilizadas para los registros electrofisiológicos en cada tratamiento. **(A)** Animales utilizados para evaluar el efecto del agonista A1 (CCPA, 300 nM). **(B)** Animales utilizados para evaluar el efecto del agonista A2A (CGS 21680, 5 μ M). **(C)** Animales utilizados para evaluar la interacción del agonista y el antagonista A1 (CCPA, 300 nM; DPCPX 100 nM). **(D)** Animales utilizados para evaluar la interacción del agonista y el antagonista A2A (CGS 21680, 5 μ M; ZM 241384 100 nM).

8.2.1 Efecto de la depleción de dopamina sobre la modulación de la transmisión excitadora corticoestriatal mediada por los receptores A1.

En la Figura 24 se presenta el curso temporal de la amplitud de las CPSEs en una NEM procedente de una rata no reserpinizada tras la aplicación del agonista A1, CCPA (300 nM) durante 30 minutos (Fig. 24 A) y en otra NEM de una rata reserpinizada (Fig. 24 B). Como se puede observar, en ambas neuronas el agonista A1 redujo la amplitud de las CPSEs durante su aplicación; observándose una mayor disminución en la NEM procedente de la rata tratada con reserpina (ver Fig 24, A' y B'). En ambas NEMs registradas, el efecto inhibitor se mantuvo hasta por 25 minutos posteriores al lavado del CCPA con solución extracelular.

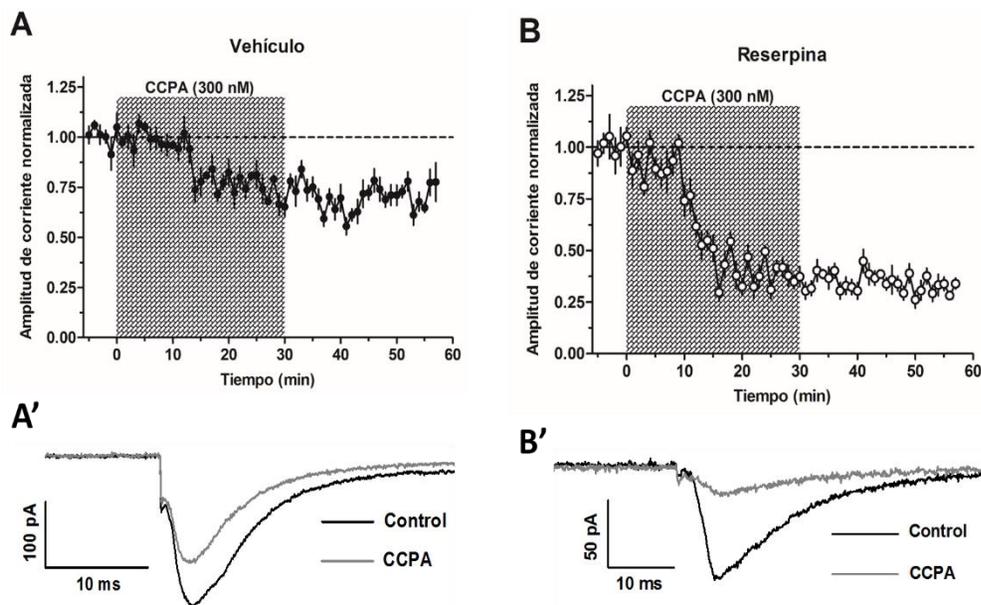


Figura 24. Efecto del agonista A1 (CCPA) sobre la amplitud normalizada de las CPSEs en NEMs representativas de ratas tratadas con vehículo (no reserpinizadas) y con reserpina.

En las gráficas (A) y (B) se ilustra el curso temporal de las CPSEs (S1) normalizadas, y la parte sombreada indica el tiempo de aplicación del agonista A1, CCPA (300 nM) durante 30 minutos. Cada punto representa la media \pm error estándar de la amplitud de seis CPSEs registradas en intervalos de 1 minuto. En las Figuras (A') y (B') cada trazo representa el promedio de 30 CPSEs registradas durante los últimos 5 minutos en la condición control y en presencia del CCPA. (A) NEM de una rata no reserpinizada. Resistencia de entrada: 37.6 M Ω ; amplitud normalizada en presencia del CCPA: 0.73. (A') Trazos representativos de las CPSEs de la NEM de la rata no reserpinizada. Amplitud absoluta en condición control: 247.9 pA; en presencia del CCPA: 182.8 pA; porcentaje de cambio de -26.3. (B) NEM de una rata tratada con reserpina. Resistencia de entrada: 61.4 M Ω ; amplitud normalizada en presencia del CCPA: 0.37. (B') Trazos representativos de las CPSEs de la NEM de la rata tratada con reserpina. Amplitud absoluta en condición control: 98.1 pA; en presencia del CCPA: 36.7 pA; porcentaje de cambio de -62.6.

En la Figura 25 se presenta el promedio del efecto del CCPA sobre la amplitud de las CPSEs registradas en las NEMs de las ratas no reserpinizadas (n= 7) y reserpinizadas (n= 6). Se aplicó un ANOVA de medidas repetidas de dos factores a la amplitud de las CPSEs registradas durante los 5 minutos en condiciones basales, encontrando que no existe diferencia entre ambos grupos de ratas durante ese periodo (tiempo: $F_{4,4} = 2.2$, $p = 0.23$; tratamiento: $F_{1,4} = 0.01$, $p = 0.89$). El ANOVA de medidas

repetidas de dos factores aplicado a las amplitud de las CPSEs de ambos grupos de ratas indicó que existe un efecto significativo del factor tiempo ($F_{33,363}= 26.9, p<0.0001$), pero no del factor tratamiento ($F_{1,363}= 1.8, p= 0.19$) ni de la interacción entre ambos factores ($F_{1,363}= 0.8, p= 0.67$). Estos resultados indican que en ambos grupos de ratas el agonista A1 disminuyó la amplitud de las CPSEs, siendo más pronunciado el efecto en aquellas ratas con depleción de dopamina, aunque la diferencia no fue significativa ($p> 0.05$, prueba post hoc Bonferroni).

Cabe señalar que en la Figura 25 no se ilustra la amplitud de las corrientes durante el periodo de 30 minutos de lavado del fármaco debido a que solamente 4 neuronas de ratas no reserpinizadas y 5 neuronas de ratas tratadas con reserpina sobrevivieron este periodo de lavado.

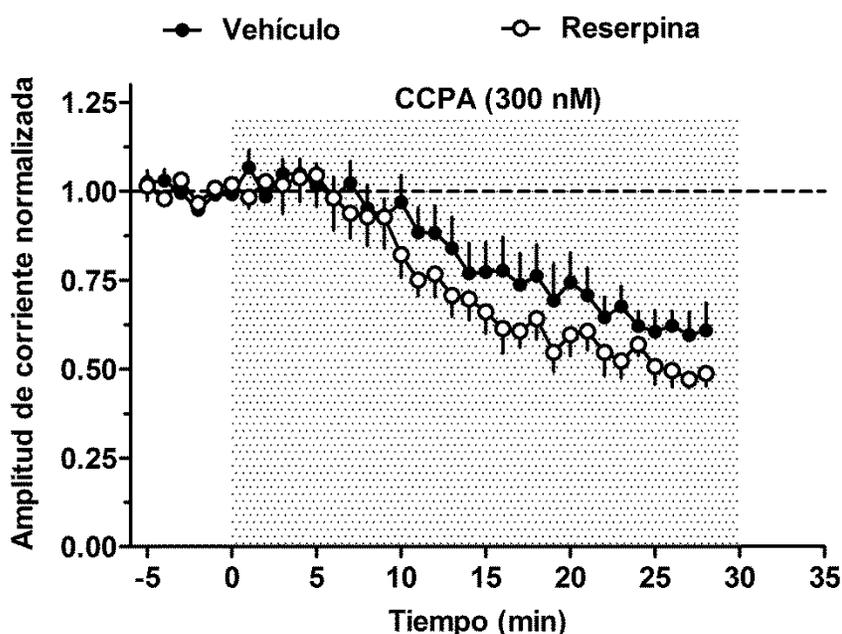


Figura 25. Efecto del agonista A1 sobre el curso temporal de la amplitud normalizada de las CPSEs inducidas por estimulación corticoestriatal en las NEMs de ratas reserpinizadas y no reserpinizadas (Vehículo).

Se ilustra la amplitud de las CPSEs durante los últimos 5 minutos en condiciones control y los 30 minutos de la aplicación del agonista A1 (CCPA, 300 nM, parte sombreada). Cada punto representa la media \pm error estándar de la amplitud de las CPSEs registradas en intervalos de 1 minuto. Resistencia de entrada de las NEMs de ratas no reserpinizadas (Vehículo, n=7): $48.4 \pm 10.5 \text{ M}\Omega$. Resistencia de entrada de las NEMs de ratas reserpinizadas (n=6): $54.3 \pm 11.2 \text{ M}\Omega$.

Para comparar el efecto del agonista A1 en las NEMs de ambos grupos de ratas, se promediaron los valores absolutos de las amplitudes de las CPSEs en los últimos 5 minutos antes de la aplicación del CCPA (300 nM) y en los últimos 5 minutos en presencia del mismo. Con la utilización de la prueba pareada de rangos signados de Wilcoxon de una cola, se observó un decremento significativo en la amplitud de las CPSEs después de la aplicación del agonista A1 tanto en las NEMs de ratas no reserpinizadas ($p= 0.008$, ver Fig. 26 A) como en las reserpinizadas ($p= 0.016$, ver Fig. 26 B).

Debido a que existió mucha variación en la amplitud absoluta de las CPSEs registradas, se decidió normalizar todos los valores registrados tomando como referencia las CPSEs de los últimos 5 minutos antes de la exposición al CCPA. Analizando los datos normalizados con la prueba pareada de rangos signados de Wilcoxon de una cola se observó que el agonista A1 disminuyó la amplitud de las CPSEs de las NEMs, tanto de las ratas no reserpinizadas ($p= 0.016$) como de las reserpinizadas ($p= 0.031$), con respecto a la amplitud de las CPSEs en condiciones control (ver Fig 26 C y D).

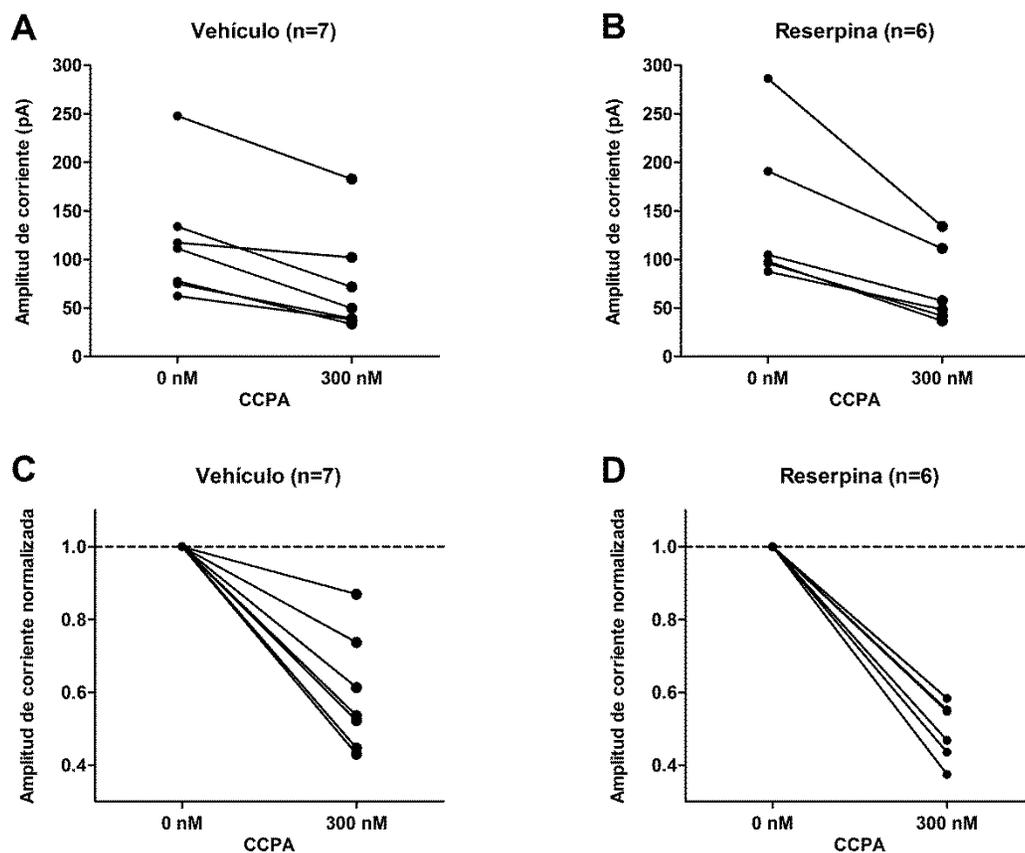


Figura 26. Amplitud de las CPSEs antes y después de la aplicación del agonista selectivo de receptores de adenosina de tipo A1.

Cada símbolo representa el promedio de la amplitud absoluta (**A** y **B**) y normalizada (**C** y **D**) de las CPSEs registradas durante los últimos 5 minutos en condiciones basales y los últimos 5 minutos en presencia del agonista A1 (CCPA, 300 nM). Se presentan las medias \pm desviación estándar de las amplitudes absolutas y error estándar de las amplitudes normalizadas de las CPSEs. (**A**) Amplitud absoluta de las CPSEs en las NEMs de ratas no resepinizadas (Vehículo). Condiciones control: 117.9 ± 62.9 pA; en presencia del CCPA: 73.8 ± 53.7 pA. (**B**) Amplitud absoluta de las CPSEs en las NEMs provenientes de ratas tratadas con reserpina. Condiciones control: 143.9 ± 79.5 pA; en presencia del CCPA: 71.6 ± 40.8 pA. (**C**) Amplitud normalizada de las CPSEs en las NEMs de ratas no resepinizadas (Vehículo). Amplitud de las CPSEs en presencia del CCPA: 0.59 ± 0.06 . (**D**) Amplitud normalizada de las CPSEs en las NEMs provenientes de ratas tratadas con reserpina. Amplitud de las CPSEs en presencia del CCPA: 0.49 ± 0.03 .

Con la finalidad de determinar si existe una diferencia en la velocidad del efecto del agonista A1 en las NEMs de ratas no reserpinizadas y tratadas con reserpina, se comparó el tiempo en que el CCPA produce el 50% de la máxima inhibición en las CPSE. El análisis con la prueba *t* de Student no pareada con la corrección de Welch ($t_9=0.34$, $p=0.36$) indicó que no existe diferencia en el tiempo en el que se produce el 50% del máximo efecto del agonista A1 entre ambos grupos de ratas (ver Fig. 27).

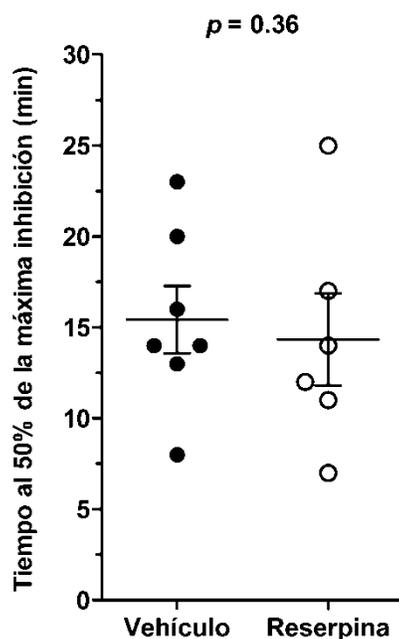


Figura 27. Tiempo (min) en que se alcanza el 50% de la máxima inhibición de la amplitud de las corrientes sinápticas de las NEMs tras la aplicación del agonista A1.

Cada símbolo representa los minutos transcurridos hasta que la amplitud de la CPSE disminuyó a la mitad (50%) del máximo efecto para cada neurona. Las líneas representan la media \pm error estándar. No reserpinizadas (Vehículo, $n=7$): 15.43 ± 1.85 min. Reserpina: ($n=6$): 14.33 ± 2.52 min.

La técnica del protocolo de pulso pareado se utiliza para determinar si el efecto de los fármacos se realiza a nivel presináptico o postsináptico; para lo cual se determinó el cambio porcentual en el cociente de pulso pareado (CPP) durante los últimos 5 minutos en presencia del agonista A1, (CCPA, 300 nM), tomando como referencia el promedio del CPP de los 5 minutos finales en condiciones basales (100 %). En la Figura

28 A se aprecia que en las ratas no reserpinizadas el agonista A1 causó, en promedio, un pequeño incremento en el CPP ($4.7 \pm 4.9 \%$), el cual no fue significativo ($p= 0.234$, prueba pareada de rangos signados de Wilcoxon de una cola). En cambio, en las ratas tratadas con reserpina (Fig. 28 B) el agonista A1 produjo, en promedio, un aumento del CPP ($12.9 \pm 3.3 \%$) que fue significativo ($p= 0.016$, prueba pareada de rangos signados de Wilcoxon de una cola), sugiriendo que la depleción de dopamina favorece una acción presináptica del agonista A1 para reducir la probabilidad de liberación de glutamato de la vía corticoestriatal.

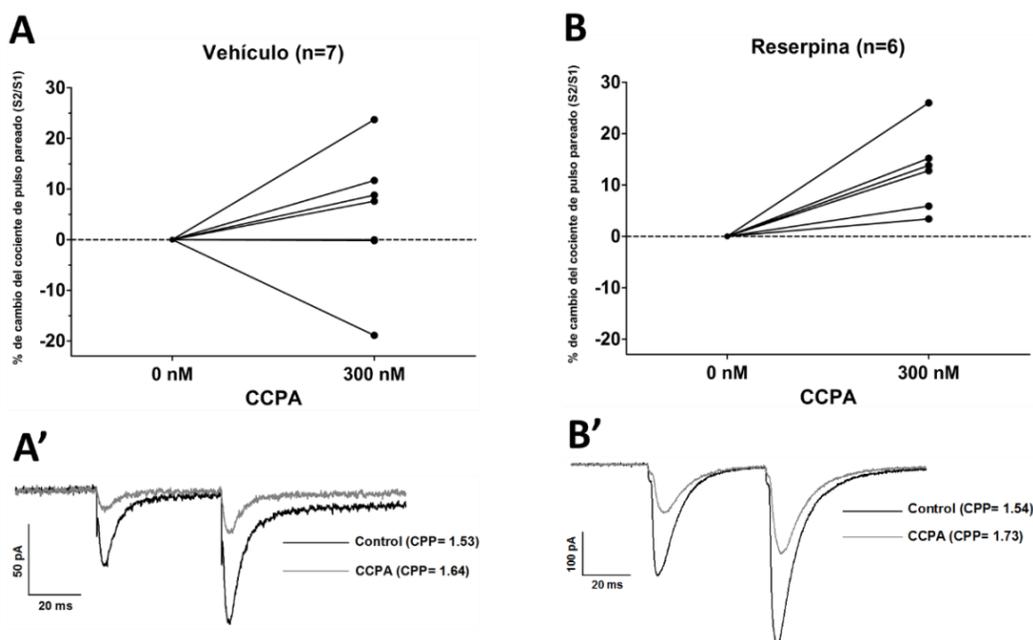


Figura 28. Cambio porcentual del cociente de pulso pareado (CPP: S2/S1) después de la aplicación del agonista selectivo de los receptores de adenosina de tipo A1.

(A) Porcentaje de cambio del CPP antes y durante la aplicación del CCPA en las NEMs de ratas no reserpinizadas (Vehículo). (A') Trazos representativos de las amplitudes S1 y S2 tras la aplicación del protocolo del pulso pareado de una NEM proveniente de una rata no reserpinizada en condiciones basales (línea negra) y en presencia del agonista A1 (línea gris). CPP en condiciones control: 1.53; en presencia del CCPA: 1.64; porcentaje de cambio: 7.6 %. (B) Porcentaje de cambio del CPP antes y durante la aplicación del CCPA en las NEMs de ratas reserpinizadas. (B') Trazos representativos de las amplitudes S1 y S2 tras la aplicación del protocolo del pulso pareado en una NEM proveniente de una rata reserpinizada, en condiciones basales (línea negra) y en presencia del agonista A1 (línea gris). CPP en condiciones control: 1.54; en presencia del CCPA: 1.73; porcentaje de cambio: 12.8%.

Para corroborar si el efecto del CCPA en la amplitud de las CPSEs y del CPP es diferente en ratas con la inervación dopaminérgica intacta y en ratas con depleción de dopamina, se comparó el cambio porcentual inducido por el agonista A1 entre ambos grupos de ratas. En la Figura 29 A se muestra que la disminución de la amplitud de las CPSEs al estimular el receptor A1 es en promedio menor en las NEMs del grupo no reserpínizado (Vehículo) que en las del grupo Reserpina, pero la diferencia no fue significativa ($t_9 = 1.45$, $p=0.09$, prueba t de Student no pareada, de una cola, con la corrección de Welch).

En la Figura 29 B se muestra que el aumento en el CPP al estimular el receptor A1 es en promedio menor en las NEM del grupo Vehículo (no reserpínizado) que en las del grupo Reserpina, pero la diferencia entre ambos grupos tampoco fue significativa ($t_{10} = 1.37$, $p=0.09$, prueba t de Student no pareada, de una cola, con la corrección de Welch).

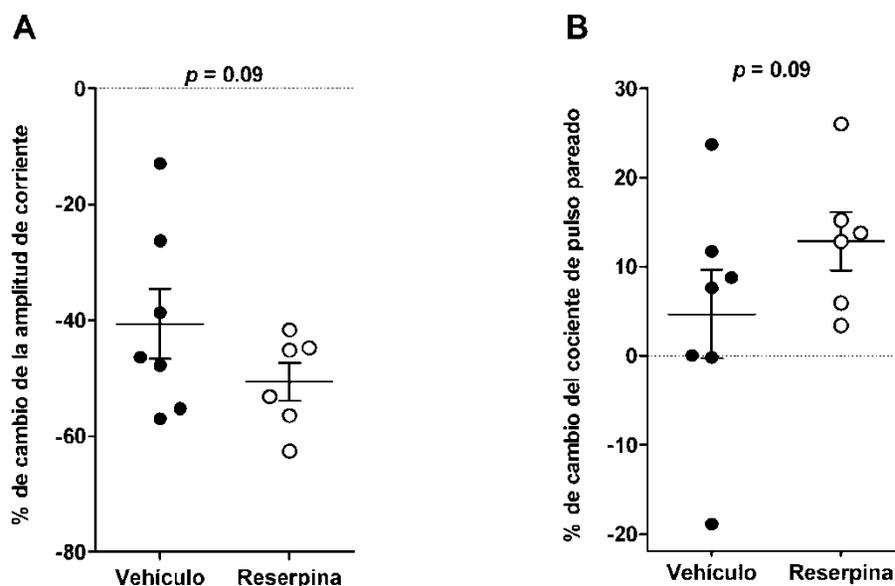


Figura 29. Efecto del agonista A1 sobre el porcentaje de cambio de la amplitud de las CPSEs normalizadas y del CPP inducido por la estimulación corticoestriatal en las NEM de ratas no reserpinizadas y tratadas con reserpina.

En ambas gráficas cada punto representa la diferencia de la amplitud de las CPSEs (en **A**) y del CPP (S2/S1) (en **B**) durante los últimos 5 minutos en condiciones basales y los últimos 5 minutos en presencia del agonista A1 (CCPA, 300 nM). Las líneas representan la media \pm error estándar. **(A)** Porcentaje de cambio de la amplitud de las CPSEs en las NEMs de ambos grupos de ratas tras la aplicación del agonista A1. No reserpinizadas (Vehículo, n=7): en presencia del CCPA = 0.59 ± 0.06 ; cambio = -40.6 ± 6 %. Reserpina (n=6): en presencia del CCPA = 0.49 ± 0.03 ; cambio = -50.6 ± 3.3 %. **(B)** Porcentaje de cambio del CPP en las NEMs de ambos grupos de ratas tras la aplicación del agonista A1. No reserpinizadas (Vehículo, n=7): condición basal = 1.43 ± 0.06 ; en presencia del CCPA = 1.48 ± 0.06 ; cambio = 4.7 ± 4.9 %. Reserpina (n=6): condición basal = 1.34 ± 0.14 ; en presencia del CCPA = 1.49 ± 0.14 ; cambio = 12.8 ± 3.25 %.

Después de analizar el efecto del agonista A1 sobre las CPSEs, se realizaron registros electrofisiológicos utilizando además el antagonista A1, DPCPX. En la Figura 30 se ilustran los tres registros electrofisiológicos que se han obtenido hasta el momento en las NEMs de ratas no reserpinizadas, observándose que en los tres registros la aplicación del antagonista A1 no produjo ningún cambio en la amplitud de las CPSEs. En dos neuronas, la aplicación simultánea del agonista A1 (CCPA) con el antagonista A1 (DPCPX) no modificó la amplitud de las CPSEs, indicando un efecto antagónico (Fig. 30, A y B). En una neurona se produjo un aumento paradójico de la amplitud de las CPSEs al aplicar simultáneamente el agonista y antagonista A1 (Fig. 30 C). Se requiere realizar más experimentos para corroborar este último hallazgo.

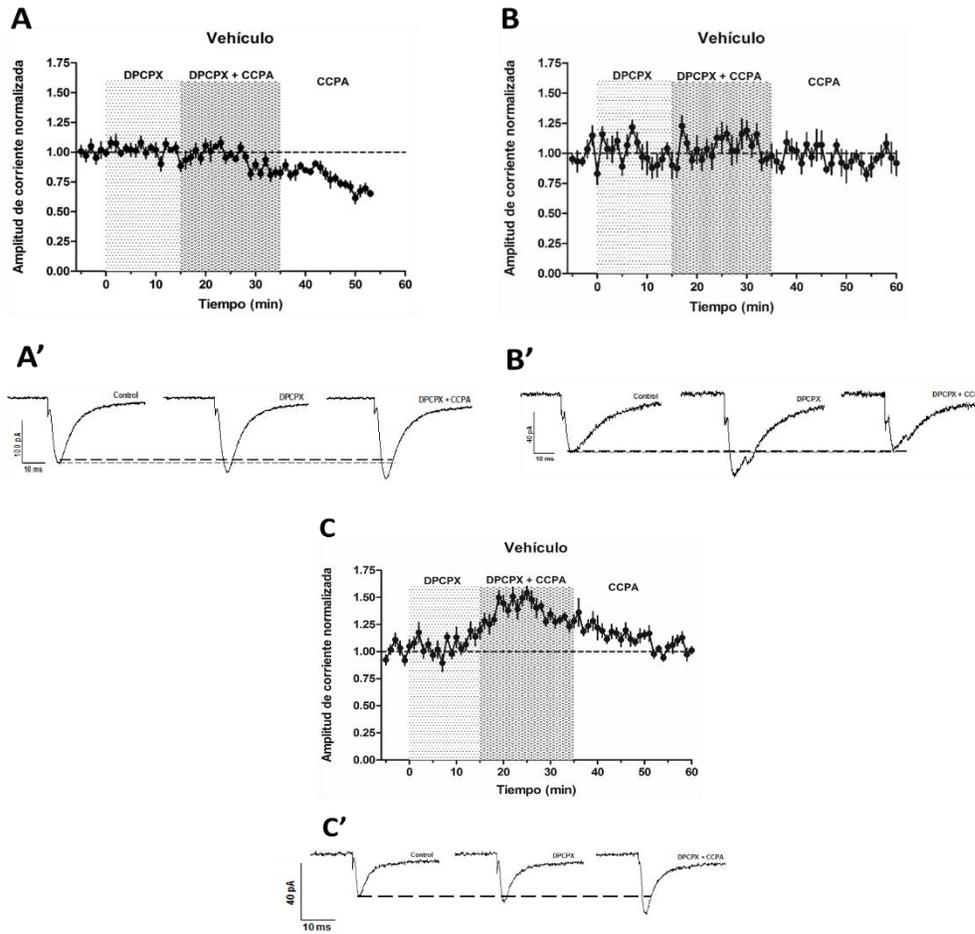


Figura 30. Interacción del antagonista A1 (DPCPX) y el agonista A1 (CCPA) sobre la amplitud normalizada de las CPSEs en las NEMs de ratas tratadas con el vehículo (no reserpinizadas).

El curso temporal de las CPSEs normalizadas de tres NEMs de ilustran en las gráficas (A), (B) y (C), y la parte sombreada clara indica el tiempo de aplicación del antagonista A1 (DPCPX, 100 nM) durante 15 minutos; la parte sombreada oscura indica la co-aplicación del DPCPX y el agonista A1 (CCPA, 300 nM) durante 20 minutos. Cada punto representa la media \pm error estándar de la amplitud de seis CPSEs registradas en intervalos de 1 minuto. (A) NEM (# 121.1): resistencia de entrada: 26.6 M Ω . (B) NEM (#121.2): resistencia de entrada: 50.4 M Ω . (C) NEM (#125.1): resistencia de entrada: 33.3 M Ω . Las Figuras (A'), (B') y (C') muestran trazos representativos de la amplitud de las CPSEs de las tres NEMs, obtenidos promediando las 30 CPSEs registradas durante los últimos 5 minutos en la condición control, en presencia del DPCPX y la co-aplicación del DPCPX y el CCPA. (A') NEM (# 121.1), amplitud absoluta en: control (162.4 pA), en presencia del DPCPX (163.9 pA) y DPCPX + CCPA (139.5 pA). (B') NEM (# 121.2), amplitud absoluta en: control (156.9 pA), en presencia del DPCPX (148.4 pA) y DPCPX + CCPA (166.3 pA). (C') NEM (# 125.1), amplitud absoluta en: control (68.9 pA), en presencia del DPCPX (76.5 pA) y DPCPX + CCPA (89.1 pA).

En dos NEMs del grupo de ratas tratadas con reserpina se han obtenido registros electrofisiológicos de la interacción entre el antagonista A1 (DPCPX) y el agonista A1 (CCPA). En una de ellas el DPCPX no modificó la amplitud de las CPSEs mientras que en la otra produjo un incremento (Fig. 31). La co-aplicación del DPCPX y el CCPA parece no tener efecto en las CPSE de las ratas tratadas con reserpina, pero aún falta aumentar el número de observaciones para corroborar esta observación.

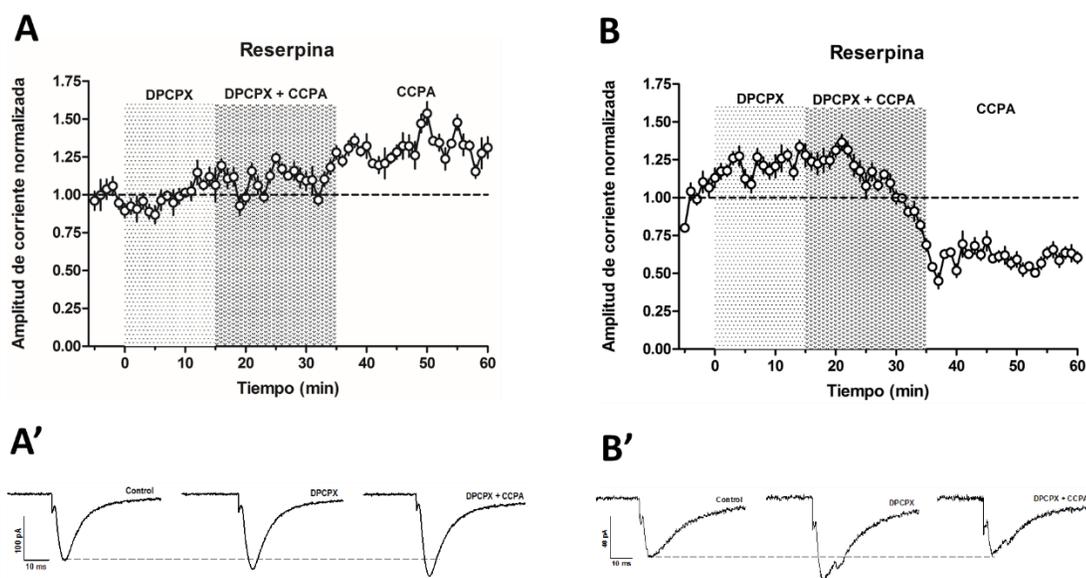


Figura 31. Interacción del antagonista A1 (DPCPX) y el agonista A1 (CCPA) sobre la amplitud normalizada de las CPSEs en las NEMs de ratas tratadas con reserpina.

El curso temporal de las CPSEs normalizadas de tres NEMs se ilustra en las gráficas (A) y (B), y la parte sombreada clara indica el tiempo de aplicación del antagonista A1 (DPCPX, 100 nM) durante 15 minutos y la parte sombreada oscura indica la co-aplicación del DPCPX y el agonista A1 (CCPA, 300 nM) durante 20 minutos. Cada punto representa la media \pm error estándar de la amplitud de seis CPSEs registradas en intervalos de 1 minuto. (A) NEM (# 120.2): resistencia de entrada: 39.9 M Ω . (B) NEM (# 126): resistencia de entrada: 37 M Ω . Las Figuras (A') y (B') muestran trazos representativos de la amplitud de las CPSEs de las dos NEMs, obtenidos promediando las 30 CPSEs registradas durante los últimos 5 minutos en la condición control, en presencia del DPCPX y la co-aplicación del DPCPX y el CCPA. (A') NEM (# 120.2); amplitud absoluta en: control (95.3 pA); en presencia del DPCPX (71 pA) y DPCPX + CCPA (86.3 pA). (B') NEM (# 126); amplitud absoluta en: control (80.2 pA); en presencia del DPCPX (100.3 pA) y DPCPX + CCPA (74.4 pA).

8.2.2 Efecto de la depleción de dopamina sobre la modulación de la transmisión excitadora corticoestriatal mediada por los receptores A2A

A diferencia de la acción inhibitoria del agonista A1, CCPA, sobre la amplitud de las CPSEs en las NEMs de ambos grupos de ratas; la aplicación del agonista A2A causó efectos diferentes en las corrientes sinápticas inducidas por la estimulación corticoestriatal en las NEMs de las ratas no reserpinizadas y tratadas con reserpina. Como ejemplo se muestra el curso temporal de la amplitud de las CPSEs en una NEM procedente de una rata no reserpinizada (Fig. 32 A) y en otra procedente del grupo Reserpina (Fig. 32 B), tras la aplicación del agonista A2A, CGS 21680 (5 μ M) durante 20 minutos. Como se puede observar, el agonista A2A no modificó la amplitud de las CPSEs en la NEM cuya inervación dopaminérgica está intacta (Fig. 32 A); sin embargo, tras la depleción de dopamina con el esquema de reserpina, la activación de los receptores A2A por el agonista CGS 21680 produjo un aumento en la amplitud de las CPSEs inducidas en la NEM por la estimulación corticoestriatal (Fig. 32 B).

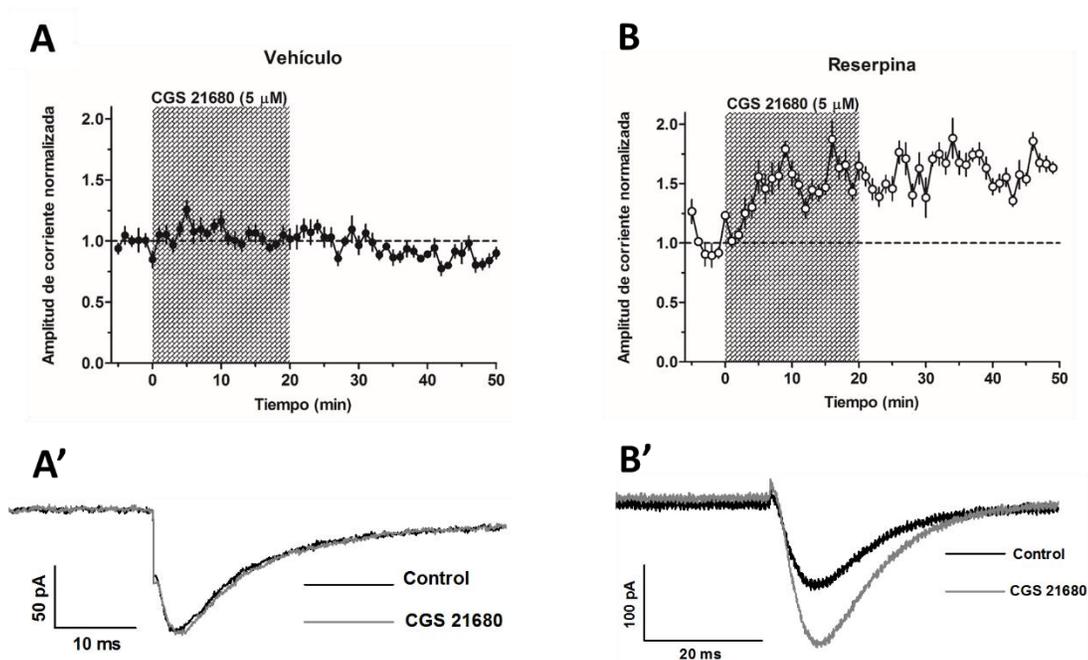


Figura 32. Efecto del agonista A2A (CGS 21680) sobre la amplitud normalizada de las CPSEs en NEMs representativas de ratas tratadas con vehículo (no reserpinizadas) y con reserpina.

En las gráficas (A) y (B) se ilustra el curso temporal de las CPSEs (S1) normalizadas, y la parte sombreada indica el tiempo de aplicación del agonista A2A (CGS 21680, 5 μ M) durante 20 minutos. Cada punto representa la media \pm error estándar de la amplitud de seis CPSEs registradas en intervalos de 1 minuto. En las Figuras (A') y (B') cada trazo representa el promedio de 30 CPSEs registradas durante los últimos 5 minutos en la condición control y en presencia del CGS 21680. (A) NEM de una rata no reserpinizada (Vehículo). Resistencia de entrada: 45.9 M Ω ; amplitud normalizada en presencia del CGS 21680: 1.0. (A') Trazos representativos de la amplitud de las CPSEs de la NEM de la rata no reserpinizada, en condiciones basales (línea negra) y en presencia del agonista A2A (línea gris). Amplitud absoluta en condición control: 116.4 pA; en presencia del CGS 21680: 117.8 pA; porcentaje de cambio de 1.2. (B) NEM de una rata tratada con reserpina. Resistencia de entrada: 64.6 M Ω ; amplitud normalizada en presencia del CGS 21680: 1.6. (B') Trazos representativos de la amplitud de las CPSEs de la NEM de la rata tratada con reserpina, en condiciones basales (línea negra) y en presencia del agonista A2A (línea gris). Amplitud absoluta en condición control: 128.3 pA; en presencia del CGS 21680: 211.7 pA; porcentaje de cambio de 65.

En la Figura 33 se presenta el promedio del efecto del CGS 21680 sobre la amplitud de las CPSEs registradas en las NEMs de las ratas no reserpinizadas (n= 7) y tratadas con reserpina (n= 6). Se aplicó un ANOVA de medidas repetidas de dos factores a la amplitud de las CPSEs registradas durante los 5 minutos en condiciones basales, encontrando que no existe diferencia entre ambos grupos de ratas durante ese periodo (tiempo: $F_{4,4} = 2$, $p = 0.25$; tratamiento: $F_{1,4} = 0.009$, $p = 0.92$).

Se observa que la aplicación del agonista A2A (CGS 21680, 5 μ M) produjo en promedio un aumento en la amplitud de las CPSEs de las ratas con depleción de dopamina en comparación con las ratas con la inervación dopaminérgica intacta en donde el agonista A2A no tuvo efecto; sin embargo esta diferencia no fue significativa tras la aplicación del ANOVA de medidas repetidas de dos factores entre el grupo Vehículo y Reserpina (factor tiempo: $F_{24,264} = 1.78$, $p = 0.015$; interacción del factor tiempo y tratamiento: $F_{1,264} = 3.03$, $p < 0.0001$; factor tratamiento: $F_{1,11} = 1.79$, $p = 0.208$). Cabe señalar que no se ilustró la amplitud de las CPSEs durante el periodo de 30 minutos de lavado del fármaco debido a que solamente 5 neuronas procedentes de ratas no reserpinizadas y 4 de ratas tratadas con reserpina sobrevivieron a este periodo de lavado, motivo por el cual no fue posible observar si el efecto del fármaco fue reversible.

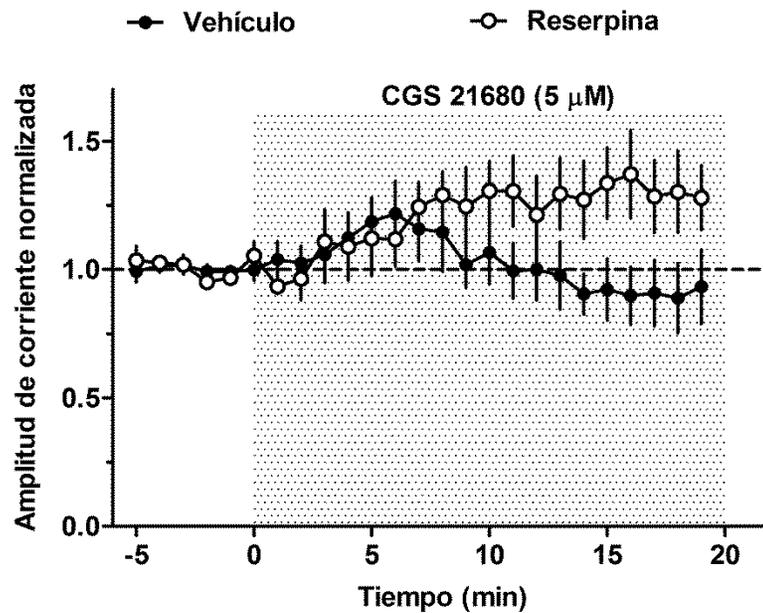


Figura 33. Efecto del agonista A2A sobre el curso temporal de la amplitud normalizada de las CPSEs inducidas por estimulación corticoestriatal en las NEM de ratas reserpinizadas y no reserpinizadas (Vehículo).

Se ilustra la amplitud de las CPSEs durante los 5 minutos en condiciones control y los 20 minutos de aplicación del agonista A2A (CGS 21680, 5 μ M; parte sombreada). Cada punto representa la media \pm error estándar de la amplitud de las CPSEs registradas en intervalos de 1 minuto. Resistencia de entrada en las NEMs de ratas no reserpinizadas (n=7): $46.7 \pm 9.1 \text{ M}\Omega$. Resistencia de entrada en las NEMs de ratas reserpinizadas (n=6): $54.7 \pm 16.7 \text{ M}\Omega$.

Para comparar el efecto del agonista A2A sobre la amplitud de las CPSEs en ambos grupos de ratas, se promediaron los valores absolutos de las amplitudes de las CPSEs en los últimos 5 minutos del registro basal y en los últimos 5 minutos en presencia del CGS 21680. La prueba pareada de rangos signados de Wilcoxon de una cola indicó que no existe efecto significativo del agonista A2A sobre la amplitud de las CPSEs registradas en las NEMs de ratas no reserpinizadas ($p = 0.148$, ver Fig. 34 A) ni en las reserpinizadas ($p = 0.078$, ver Fig. 34 B).

Debido a la variabilidad que presentaron los registros electrofisiológicos, los valores absolutos de las CPSEs registradas se normalizaron con respecto a la amplitud de las corrientes en los últimos 5 minutos en el periodo basal debido a la variabilidad

que presentaron los registros electrofisiológicos. En la Figura 34 C y D, se observa que el agonista A2A produjo cambios opuestos en la amplitud de las CPSEs de las NEM provenientes de ambos grupos de ratas. Así, en las NEM de ratas con la innervación dopaminérgica intacta el CGS 21680 produjo con mayor frecuencia una disminución en la amplitud de las CPSEs (Fig. 34 C); mientras que en las ratas depletadas de dopamina el efecto más común fue un aumento en la amplitud de las CPSEs (Fig. 34 D). Sin embargo, a pesar estas tendencias opuestas, no se encontró efecto significativo entre ambos grupos de ratas (no reserpinizadas: $p= 0.289$; reserpinizadas: $p= 0.078$, prueba pareada de rangos signados de Wilcoxon de una cola), por lo que será necesario incrementar el número de neuronas para confirmar si el agonista A2A produce efectos opuestos en las NEMs en ambos grupos de ratas.

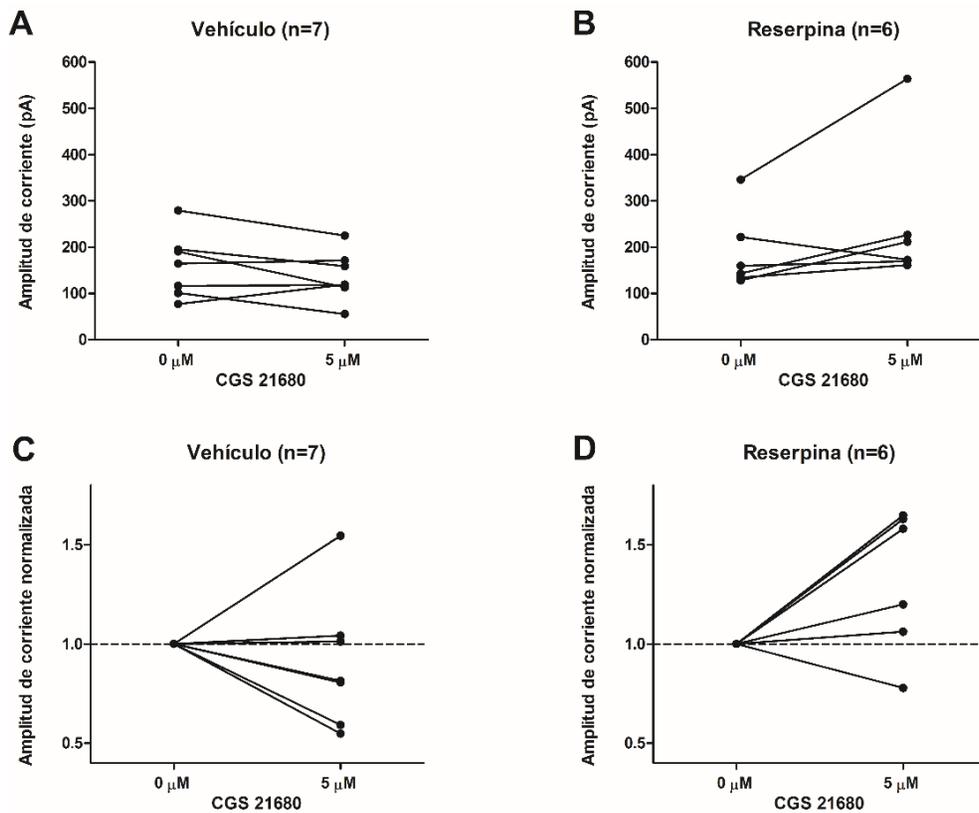


Figura 34. Amplitud de las CPSEs antes y después de la aplicación del agonista selectivo de receptores de adenosina de tipo A2A.

Cada símbolo representa el promedio de la amplitud absoluta (**A** y **B**) y normalizada (**C** y **D**) de las CPSEs registradas durante los últimos 5 minutos en condiciones basales y los últimos 5 minutos en presencia del agonista A2A, CGS 21680 (5 μM). Se presentan las medias ± desviación estándar de las amplitudes absolutas y error estándar en las amplitudes normalizadas de las CPSEs. (**A**) Amplitud absoluta de las CPSEs en las NEMs de ratas no resepinizadas (Vehículo). Condiciones control: 160.6 ± 69.1 pA; presencia del CGS 21680: 137.2 ± 53.8 pA. (**B**) Amplitud absoluta de las CPSEs en las NEMs de ratas tratadas con reserpina. Condiciones control: 188.9 ± 84.1 pA; en presencia del CGS 21680: 250.9 ± 155.6 pA. (**C**) Amplitud normalizada de las CPSEs en las NEMs de ratas no resepinizadas (Vehículo). Amplitud normalizada de las CPSEs en presencia del CGS 21680: 0.9 ± 0.12 . (**D**) Amplitud normalizada de las CPSEs en las NEMs de ratas tratadas con reserpina. Amplitud de las CPSEs en presencia del CGS 21680: 1.31 ± 0.15 .

Se determinó el cambio porcentual en el cociente de pulso pareado (CPP) durante los últimos 5 minutos de la aplicación del agonista A2A, CGS 21680, tomando como referencia el promedio del CPP de los últimos 5 minutos en condiciones basales (100

%). En las NEMs de ratas no reserpinizadas (Fig. 35 A) el CGS 21680 causó en promedio un incremento en el CPP (8.8 ± 7.6 %), el cual no fue significativo ($p= 0.234$, prueba pareada de rangos signados de Wilcoxon de una cola); sin embargo, en las ratas reserpinizadas (Fig. 35 B) el agonista A2A produjo una disminución significativa del CPP (-7.4 ± 3.9 %; $p= 0.047$, prueba pareada de rangos signados de Wilcoxon de una cola), sugiriendo que la depleción de dopamina favorece una acción presináptica del agonista A2A para aumentar la probabilidad de liberación de glutamato de la vía corticoestriatal.

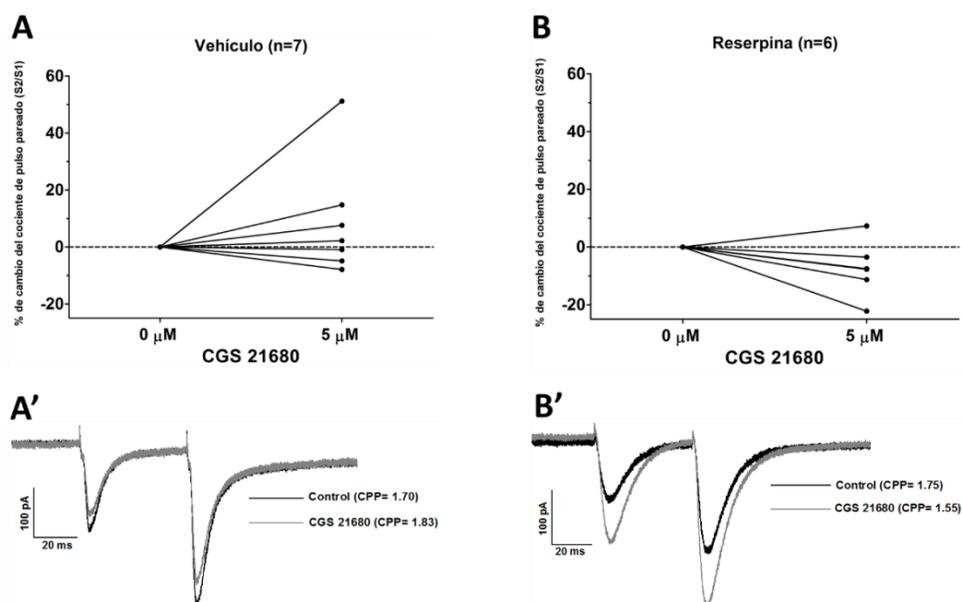


Figura 35. Cambio porcentual del cociente de pulso pareado (CPP: S2/S1) después de la aplicación del agonista selectivo de los receptores de adenosina de tipo A2A.

(A) Porcentaje de cambio del CPP antes y durante la aplicación del CGS 21680 en las NEMs de ratas no reserpinizadas (Vehículo). (A') Trazos representativos de las amplitudes S1 y S2 tras la aplicación del protocolo del pulso pareado en una NEM proveniente de una rata no reserpinizada, en condiciones basales (línea negra) y en presencia del agonista A2A (línea gris). CPP en condiciones control: 1.70; en presencia del CGS 21680: 1.83; porcentaje de cambio: 7.6 %. (B) Porcentaje de cambio del CPP antes y durante la aplicación del CGS 21680 en las NEMs de ratas reserpinizadas. (B') Trazos representativos de las amplitudes S1 y S2 tras la aplicación del protocolo del pulso pareado en una NEM proveniente de una rata reserpinizada, en condiciones basales (línea negra) y en presencia del agonista A2A (línea gris). CPP en condiciones control: 1.8; en presencia del CGS 21680: 1.6; porcentaje de cambio de -11.3.

Para corroborar si el efecto del CGS 21680 en la amplitud de las CPSEs y del CPP es diferente en ratas con la transmisión dopaminérgica intacta y en ratas con depleción de dopamina, se comparó el cambio porcentual inducido por el agonista A2A entre ambos grupos de ratas. En la Figura 36 A se muestra que la estimulación del receptor A2A produjo una disminución de la amplitud de las CPSEs en 4 de 7 NEMs de las ratas no reserpinizadas, mientras que en 5 de 6 NEMs de las ratas tratadas con reserpina el agonista A2A aumentó la amplitud de las CPSEs, haciendo que los promedios de ambos grupos sean significativamente diferentes ($t_{10} = 2.09$, $p = 0.03$, t de Student no pareada, de una cola, con la corrección de Welch). En la Figura 36 B se muestra que la estimulación del receptor A2A favorece un aumento en el CPP en las NEMs de ratas no reserpinizadas, mientras que en las del grupo Reserpina favorece una disminución, dando lugar a que sus medias difieran significativamente ($t_8 = 1.90$, $p = 0.04$, t de Student no pareada, de una cola con la corrección de Welch).

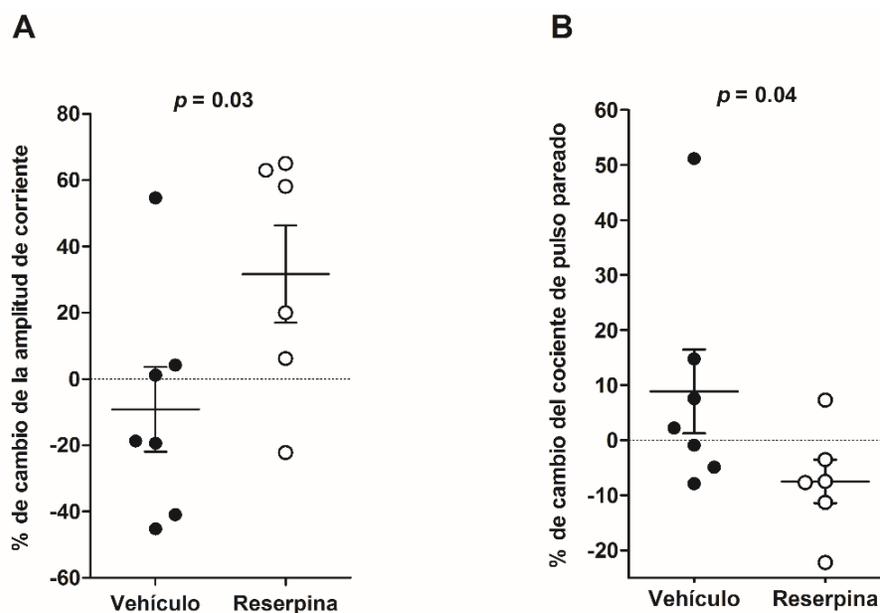


Figura 36. Efecto del agonista A2A sobre el porcentaje de cambio de la amplitud de las CPSEs normalizadas y del CPP inducido por la estimulación corticoestriatal en las NEMs de ratas no reserpinizadas y tratadas con reserpina.

En ambas gráficas cada punto representa la diferencia de la amplitud de las CPSEs (en **A**) y del CPP ($S2/S1$) (en **B**) durante los últimos 5 minutos en condiciones basales y los últimos 5 minutos en presencia del agonista A2A (CGS 21680, 5 μ M). Las líneas representan la media \pm error estándar. (**A**) Porcentaje de cambio de la amplitud de las CPSEs en las NEMs de ambos grupos de ratas tras la aplicación del agonista A2A. No reserpinizadas (Vehículo, $n=7$): en presencia del CGS 21680 = 0.90 ± 0.12 ; cambio = -9.1 ± 12.7 %. Reserpina ($n=6$): en presencia del CGS 21680 = 1.3 ± 0.14 ; cambio = 31.7 ± 14.7 %. (**B**) Porcentaje de cambio del CPP en las NEMs de ambos grupos de ratas tras la aplicación del agonista A2A. No reserpinizadas (Vehículo, $n=7$): condición basal = 1.42 ± 0.11 ; CGS 21680 = 1.50 ± 0.08 ; cambio = 8.9 ± 7.6 %. Reserpina ($n=6$): condición basal = 1.58 ± 0.10 ; CGS 21680 = 1.45 ± 0.09 ; cambio = -7.5 ± 3.9 %.

Se realizaron registros electrofisiológicos para evaluar el efecto del antagonista A2A, ZM 241385 (100 nM) sobre la amplitud de las CPSEs, para lo cual se han obtenido registros electrofisiológicos en dos NEMs de ratas no reserpinizadas; en una de ellas la aplicación del antagonista A2A no produjo ningún cambio en la amplitud de las CPSEs (Fig. 37 A), mientras que en la otra neurona el mismo fármaco incrementó las CPSEs (Fig. 37 B). La aplicación simultánea del antagonista y el agonista A2A no produjo cambios en las CPSEs en ambas NEMs registradas.

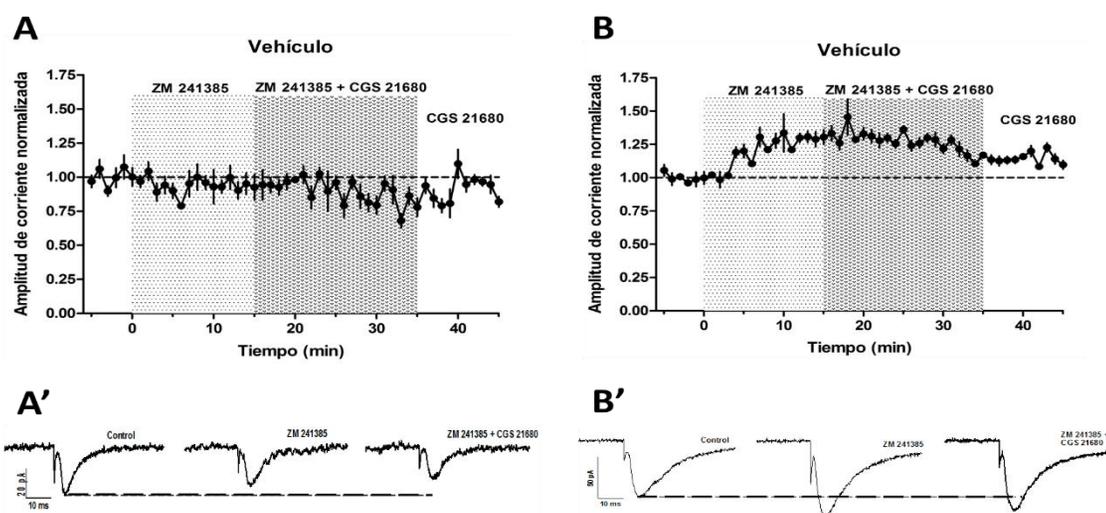


Figura 37. Interacción del antagonista A2A (ZM 241385) y el agonista A2A (CGS 21680) sobre la amplitud normalizada de las CPSEs en las NEMs de ratas tratadas con el vehículo (no reserpinizadas).

El curso temporal de las CPSEs normalizadas de dos NEMs se ilustran en las gráficas (A) y (B), donde la parte sombreada clara indica el tiempo de aplicación del antagonista A2A (ZM 241385, 100 nM) durante 15 minutos y la parte sombreada oscura indica la co-aplicación del ZM 241385 y el agonista A2A (CGS 21680, 5 μ M) durante 20 minutos. Cada punto representa la media \pm error estándar de la amplitud de seis CPSEs registradas en intervalos de 1 minuto. (A) NEM (# 147): resistencia de entrada= 40.4 M Ω . (B) NEM (# 157): resistencia de entrada= 65.7 M Ω . Las Figuras (A') y (B') muestran trazos representativos de la amplitud de las CPSEs de las dos NEMs, obtenidos promediando las 30 CPSEs registradas durante los últimos 5 minutos en la condición control, en presencia del ZM 241385 y la co-aplicación del ZM 241385 y el CGS 21680. (A') NEM (#147) con la amplitud absoluta en: control (47.6 pA), en presencia del ZM 241385 (44.8 pA) y ZM 241385 + CGS 21680 (39.9 pA). (B') NEM (#157) con la amplitud absoluta en: control (84.4 pA), en presencia del ZM 241385 (108.9 pA) y ZM 241385 + CGS 21680 (101.7 pA).

En el grupo de ratas tratadas con reserpina, la interacción entre el agonista y antagonista A2A se ha evaluado hasta ahora solo en cuatro neuronas. Como se observa en la Figura 38 A, durante la aplicación aislada del antagonista A2A ocurrió una disminución de las CPSEs registradas en una de las NEMs, mientras que en la otra no hubo cambio. Por otro lado, durante la co-aplicación del antagonista A2A con el agonista CGS 21680 en ambas NEMs se produjo una disminución aproximada del 50% de la amplitud de las CPSEs registradas (Figura 38 A y B).

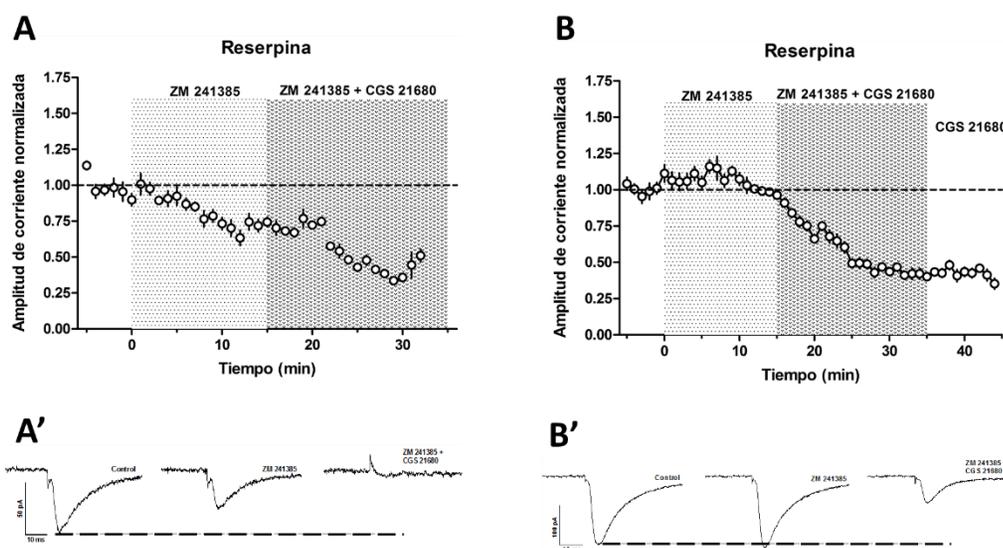


Figura 38. Interacción del antagonista A2A (ZM 241385) y el agonista A2A (CGS 21680) sobre la amplitud normalizada de las CPSEs en las NEMs de ratas tratadas con reserpina.

El curso temporal de las CPSEs normalizadas de dos NEMs de ilustra en las gráficas (A) y (B), donde la parte sombreada clara indica el tiempo de aplicación del antagonista A2A (ZM241385, 100 nM) durante 15 minutos; la parte sombreada oscura indica la co-aplicación del ZM 241385 y el agonista A2A (CGS 21680, 5 μ M) durante 20 minutos. Cada punto representa la media \pm error estándar de la amplitud de seis CPSEs registradas en intervalos de 1 minuto. (A) NEM (# 144): resistencia de entrada= 51.9 M Ω . (B) NEM (Código 154): resistencia de entrada= 53.1 M Ω . Las Figuras (A') y (B') muestran trazos representativos de la amplitud de las CPSEs de las dos NEMs, obtenidos promediando las 30 CPSEs registradas durante los últimos 5 minutos en la condición control, en presencia del ZM 241385 y la co-aplicación del ZM 241385 y el CGS 21680. (A') NEM (#144) con la amplitud absoluta en: control (76.3 pA), en presencia del ZM 241385 (53.9 pA) y ZM 241385 + CGS 21680 (31.5 pA). (B') NEM (#154) con la amplitud absoluta en: control (193.3 pA), en presencia del ZM 241385 (196.7 pA) y ZM 241385 + CGS 21680 (83.4 pA).

Por otro lado, en otra NEM de una rata tratada con reserpina la aplicación del antagonista A2A no produjo ningún cambio en la amplitud de las CPSEs (Fig. 39 A), mientras que en otra ocurrió un incremento aproximado del 25 % (Fig. 39 B). En contraste con las dos neuronas ilustradas en la Fig. 38, la aplicación simultánea del ZM 241385 y el CGS 21680 no pareció modificar las CPSEs en estas otras dos NEMs de ratas reserpinizadas. Por consiguiente, aún falta realizar más experimentos para esclarecer el efecto de la interacción entre el agonista y el antagonista de los receptores A2A sobre las CPSEs de las NEMs en presencia y ausencia de dopamina.

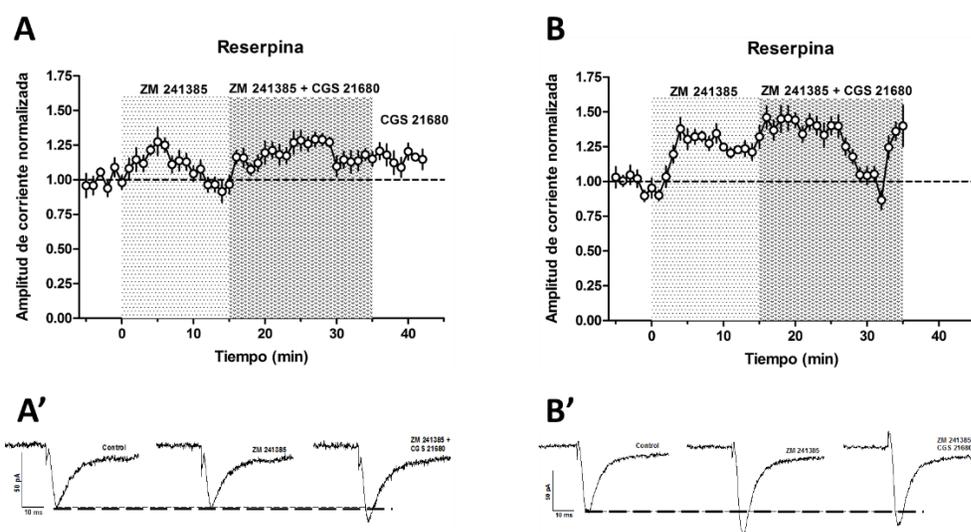


Figura 39. Interacción del antagonista A2A (ZM 241385) y el agonista A2A (CGS 21680) sobre la amplitud normalizada de las CPSEs en las NEMs de ratas tratadas con reserpina.

El curso temporal de las CPSEs normalizadas de dos NEMs se ilustra en las gráficas (A) y (B), donde la parte sombreada clara indica el tiempo de aplicación del antagonista A2A (ZM 241385, 100 nM) durante 15 minutos; la parte sombreada oscura indica la co-aplicación del ZM 241385 y el agonista A2A (CGS 21680, 5 μ M) durante 20 minutos. Cada punto representa la media \pm error estándar de la amplitud de seis CPSEs registradas en intervalos de 1 minuto. (A) NEM (#156): resistencia de entrada= 26 M Ω . (B) NEM (# 162): resistencia de entrada= 36.8 M Ω . Las Figuras (A') y (B') muestran trazos representativos de la amplitud de las CPSEs de las dos NEMs, obtenidos promediando las 30 CPSEs registradas durante los últimos 5 minutos en la condición control, en presencia del ZM 241385 y la co-aplicación del ZM 241385 y el CGS 21680. (A') NEM (# 156); amplitud absoluta en: control (74 pA); en presencia del ZM 241385 (73.5 pA) y ZM 241385 + CGS 21680 (88.9 pA). (B') NEM (# 162); amplitud absoluta en: control (103.9 pA); en presencia del ZM 241385 (127.4 pA) y ZM 241385 + CGS 21680 (115.7 pA).

9. DISCUSION

9.1.1 Efecto de la reserpina sobre el consumo de agua y alimento.

Uno de los mejores modelos animales que reproduce la sintomatología de la enfermedad de Parkinson es la lesión de la vía nigroestriatal con 6-OHDA; sin embargo su principal limitación es el desarrollo de adipsia y anorexia que provoca severa deshidratación y desnutrición global aguda, ocasionando la muerte del 50% de los animales en los primeros 5 días posteriores a la inyección de la neurotoxina (90). De igual forma se ha reportado que la presencia de estas manifestaciones fisiológicas es directamente proporcional a la destrucción de las terminales dopaminérgicas del cuerpo estriado (90).

Los cambios encontrados en el consumo de agua y alimento en las ratas utilizadas en el presente estudio después de la administración de la reserpina son similares a los observados en los animales con lesión de la vía nigroestriatal, sugiriendo que el esquema de reserpinización que implementamos mantiene niveles bajos de dopamina hasta el día 5 del sacrificio; lapso en el cual tratamientos similares de reserpinización han producido modificaciones en la expresión de neuropéptidos y receptores presentes en las NEM semejantes a los que se producen con la lesión con 6-OHDA (64, 65, 69, 70). Estos hallazgos sugieren que las dosis e intervalos utilizados en nuestro esquema de reserpinización producen cambios adaptativos similares a los que se presentan en la enfermedad de Parkinson tras la destrucción de las neuronas dopaminérgicas.

Aparte del estudio realizado por Ungerstedt y cols. (90), la búsqueda bibliográfica no arrojó otros reportes cuantitativos acerca del curso temporal del consumo de agua y alimento durante los días inmediatos al tratamiento con reserpina o con la lesión con 6-OHDA. Sin embargo, Halaris y Freedman (73), reportaron el “síndrome de reserpinización” que incluye síntomas como adipsia, anorexia, ptosis

(párpados caídos), diarrea y pérdida de peso; síntomas que se pudieron observar en nuestros animales durante la administración del esquema de reserpina.

Solamente se encontró un estudio en donde se reporta que una sola dosis de 2 mg/Kg de reserpina produce una reducción del 60% en la ingesta de alimento en las subsecuentes 24 horas posteriores a la inyección (citado en referencia 73). En el presente estudio encontramos que 24 horas después de una dosis de 5 mg/Kg de reserpina se redujo un 99% el consumo de alimento en las ratas y el de agua se redujo un 77% en promedio; esta fue la razón por la cual decidimos utilizar la alimentación intragástrica con una dieta semilíquida hipercalórica en un intento por evitar que la desnutrición y deshidratación aguda inducida por el tratamiento de reserpina afecte la salud de los animales, y por consiguiente, produzca alteraciones en los resultados obtenidos en las NEMs utilizadas para los registros electrofisiológicos.

9.1.2 Efecto de la reserpina sobre el peso corporal.

Congruente con lo reportado en la literatura, el tratamiento con reserpina causó una importante reducción de peso en los animales, que fue progresiva a lo largo del tratamiento y que posiblemente fue resultado de la adipsia y anorexia. Nosotros encontramos que 24 horas después de administrar la primera dosis de reserpina (5 mg/Kg) se produjo una pérdida de peso que en promedio fue de 15.1 %, lo cual es muy similar a la disminución del 14 % causada por la misma dosis de reserpina en el estudio de Halaris & Freedman (73). Estos mismos autores propusieron que la disminución de peso de los animales es un indicador de la depleción de las monoaminas producida por la reserpina ya que una disminución del 10% del peso corporal a las 24 horas de la administración de una dosis de reserpina de 5 mg/Kg (i.p.) se correlaciona con una depleción del 70-95% en los niveles de serotonina en el cerebro (73). Debido a que la reserpina bloquea el almacenamiento vesicular de todas las monoaminas, incluyendo las catecolaminas (91), se infiere que la pérdida de peso observada en los animales de este estudio después de la administración de 5 mg/Kg de reserpina por vía s.c. se encuentra

relacionada con una depleción de dopamina en el estriado en comparación con los animales no reserpinizados.

En el presente estudio decidimos emplear la vía subcutánea de administración debido a que se ha reportado (73) que el 100% de los animales tratados con 5 mg/Kg por vía s.c. presentaron 24 horas después una disminución de peso mayor al 10%; mientras que el 20% de los animales tratados con la misma dosis por la vía i.p. mostraron tolerancia a los efectos de la reserpina, con una disminución de peso menor al 10% a las 24 horas (73).

Con el esquema de tratamiento de reserpina utilizado en el presente estudio la disminución del peso corporal de los animales al quinto día después de la primera dosis fue en promedio del 32.6 %. Este cambio porcentual es similar al que se ha observado en animales con lesión bilateral en la vía nigroestriatal con 6-OHDA, que muestran un decremento de peso de un 28 % en el décimo día posterior a la cirugía (90, 92, 93). Cabe destacar que con las dosis de reserpina empleadas todos los animales sobrevivieron al día 5, aún sin la alimentación intragástrica, indicando que este régimen de tratamiento es bastante fiable ya que sin causar mortalidad reproduce en pocos días las alteraciones motoras que se presentan en la enfermedad de Parkinson.

Nuestros resultados demuestran que la alimentación intragástrica atenúa significativamente la disminución de peso causada por el esquema de reserpinización utilizado, evitando que exceda el 22% al quinto día, lo cual además de garantizar una mayor supervivencia podría contribuir a mejorar el estado funcional del cerebro para los registros electrofisiológicos.

9.1.3 Efecto de la reserpina sobre la catalepsia.

Un aspecto importante del modelo de parkinsonismo inducido por reserpina es su validación para determinar que reproduce las manifestaciones motoras de la enfermedad de Parkinson. Para ello empleamos el modelo de catalepsia, ya que éste permite evaluar la presencia de inmovilidad y rigidez muscular producidos por la depleción de dopamina, similares a los que se presentan en los pacientes con la enfermedad de Parkinson. Un estudio previo que evaluó la catalepsia producida por 3 dosis de reserpina de 1 mg/Kg administradas a ratas en días alternos en ratas, encontró que 30 minutos después de la última dosis las ratas permanecían asidas a la barra metálica un promedio de 126 ± 3.1 s (91). Con el esquema de reserpinización utilizado en el presente estudio se encontró que al cuarto día de tratamiento los valores de inmovilidad en la barra fueron mayores que los observados por Patil y cols. (94) con la dosis de 1 mg/Kg, puesto que en el grupo de Reserpina fue de 197.9 ± 175.7 s y en el grupo de Reserpina + ingesta fue de 290.9 ± 110.8 s. Estos hallazgos sugieren que las dosis e intervalos de administración de reserpina utilizados en nuestro estudio provocan una mayor depleción en los niveles de dopamina en el cerebro, lo que conlleva a que los animales permanezcan mayor tiempo asidos a la barra metálica.

El incremento de los tiempos de permanencia en la barra metálica encontrado en nuestro estudio es cuantitativamente similar al observado en la lesión con 6-OHDA (93, 95), corroborando que nuestro esquema de reserpinización produce un síndrome de rigidez e inmovilidad similar al que ocurre en la enfermedad de Parkinson.

Cabe recalcar que no se encontró diferencia significativa de los valores de catalepsia entre el grupo Reserpina y Reserpina + ingesta, indicando que la administración de la alimentación intragástrica no repercute en el tiempo de sujeción a la barra metálica (catalepsia) inducida con reserpina; sugiriendo que la inmovilidad de los animales puede ser producida por la depleción de la dopamina y no por la desnutrición aguda debida a la adipsia y la anorexia presentada por los animales durante el esquema

de tratamiento. Sin embargo, una de las limitaciones del tratamiento con reserpina es que la depleción de otras catecolaminas, como la serotonina y la adrenalina, también podría tener efecto en la manifestación de inmovilidad de los animales. Por tal motivo, es importante realizar mediciones de los niveles de dopamina en el estriado de las ratas durante el tratamiento de reserpina para corroborar que existe una depleción de este neurotransmisor y correlacionarlo con la manifestación de inmovilidad en los animales.

9.2 Efecto de la depleción de dopamina sobre la modulación de la transmisión excitadora corticoestriatal mediada por los receptores A1.

En el presente estudio se observó que la administración del agonista de los receptores de adenosina de tipo A1, CCPA, produjo una disminución en la amplitud de las CPSEs tanto en las ratas no reserpinizadas como en las tratadas con reserpina; y el efecto persistió aún después de 30 minutos de lavado del fármaco. Estos hallazgos son similares a los encontrados en otros estudios (44, 46) en donde la aplicación de fármacos agonistas de los mismos receptores disminuyó los PPSEs registrados en las NEMs del estriado de ratas con un efecto duradero por más de 50 minutos de lavado (44). Cabe recalcar que aun cuando el agonista A1 disminuyó las CPSEs en ambos grupos de ratas utilizadas en nuestro estudio, se observa una ligera tendencia a producir un efecto con mayor rapidez y magnitud en las ratas con depleción de dopamina. Aunque estas diferencias no fueron significativas, cabe la posibilidad que al aumentar el número de registros se observe con mayor claridad este efecto. Posiblemente esta diferencia en la magnitud del efecto del agonista CCPA entre ambos grupos de ratas se deba a que tras la depleción de dopamina en el estriado se pierde la función antagonista que ejercen los receptores D1 sobre los A1 (5), favoreciendo la activación de éstos últimos y, en consecuencia, se incrementa la inhibición de la transmisión glutamatérgica en las NEMs.

Puesto que los receptores A1 se expresan tanto en el soma de las NEMs como en las terminales corticoestriatales, para determinar si el agonista A1 inhibió la transmisión corticoestriatal a nivel pre o postsináptico el cociente de pulso pareado (CPP)

normalizado, antes y después de aplicar el CCPA. En las ratas no reserpinizadas el efecto del agonista A1 presentó mayor variabilidad, observándose que el CPP aumentó en 4 neuronas, disminuyó en una y se mantuvo sin cambios en dos. Por otro lado, en todas las NEMs de las ratas reserpinizadas el agonista A1 aumentó el CPP, dando lugar a que este efecto fuese significativo. Estos hallazgos sugieren que la depleción de dopamina sensibiliza a los receptores A1 que se encuentran a nivel presináptico en las neuronas que provienen de la corteza, de tal forma que al ser activados se produce una mayor inhibición de la probabilidad de liberación de glutamato hacia el espacio extracelular y, en consecuencia, inhibiendo la excitación de las NEMs y su envío de señales GABAérgicas inhibitorias hacia los demás núcleos del circuito motor extrapiramidal.

Aunque aún es pequeño el número de registros realizados para evaluar el efecto antagonista de los receptores A1, DPCPX (100 nM), se encontró que por sí solo este fármaco no modificó la amplitud de las CPSEs en las tres NEMs obtenidas de ratas no reserpinizadas (Vehículo); mientras que en los registros logrados en un par de neuronas de ratas reserpinizadas, el antagonista A1 no alteró la amplitud de las corrientes en una y en la otra produjo un incremento de 25 %. Este último efecto es similar a lo reportado en un estudio previo (46), en donde el DPCPX (500 nM) aumentó ligeramente el potencial postsináptico excitador (PPSE) en las NEMs y también aumentó 23 % la amplitud del componente N2 del potencial de campo, ambos inducidos por la estimulación corticoestriatal. Las observaciones anteriores sugieren que en algunas sinapsis corticoestriatales está presente la adenosina endógena en cantidades suficientes para inhibir tónicamente la transmisión sináptica excitadora y será necesario aumentar el número de observaciones para determinar si la depleción de dopamina incrementa la sensibilidad de los receptores A1 a la acción inhibitoria de este nucleósido.

Por otra parte, cuando el agonista A1, CCPA (300 nM), se aplicó en presencia del antagonista DPCPX (100 nM), la amplitud de las CPSEs permaneció sin cambios en un par de NEMs obtenidas de ratas no reserpinizadas y en una tercera neurona se

produjo un aumento inesperado de la amplitud de las corrientes; mientras que en los registros efectuados en dos neuronas de ratas reserpinizadas el agonista A1 no produjo cambios apreciables en presencia del antagonista. Tomados en conjunto, estos resultados indican que el antagonista DPCPX bloqueó el efecto del agonista CCPA, lo cual es congruente con lo reportado en algunos estudios en los que la aplicación de un antagonista A1 previno la reducción del PPSE causada por la adenosina exógena (20, 45, 46). Sin embargo, aún será necesario realizar más registros electrofisiológicos que contribuyan a esclarecer el papel de este receptor en la modulación de la transmisión corticoestriatal cuando se pierde la transmisión dopaminérgica.

9.3 Efecto de la depleción de dopamina sobre la modulación de la transmisión excitadora corticoestriatal mediada por los receptores A2A

Como se ha reportado en otros estudios, la activación de los receptores de adenosina de tipo A2A presenta un efecto opuesto a los que se observan tras la estimulación de los A1; ya que la activación de los receptores A2A favorece la liberación de glutamato al espacio sináptico estimulando la actividad de las NEMs, mientras que los A1 inhiben esta liberación. Algunos estudios han reportado que la aplicación de agonistas de los receptores A2A a rebanadas de cerebro de ratas con la innervación dopaminérgica intacta no produce modificaciones en las CPSEs ni en los PPSEs en registros intracelulares de las NEMs del estriado (44, 49, 50). En ninguno de estos estudios se bloqueó la transmisión inhibitoria intrínseca, y solo en un estudio (49) se reportó que el voltaje se fijó a -80 mV. En otro estudio los registros se hicieron bloqueando la transmisión GABAérgica inhibitoria aplicando picrotoxina en el medio extracelular, con una fijación de voltaje a -70 mV, encontrándose que el CGS 21680 (1 μ M) aumentó la amplitud de las CPSEs solo en las NEMs de la vía directa, sin afectar las de la vía indirecta (28). En nuestros registros electrofisiológicos bloqueamos la transmisión GABAérgica utilizando bicuculina en la solución extracelular o picrotoxina a nivel intracelular y el voltaje se fijó a -60 mV para asemejarlo al estado despolarizado. Bajo estas condiciones encontramos que la aplicación del CGS 21680, un agonista de los

receptores A2A, en rebanadas de cerebro de las ratas no reserpinizadas disminuyó las CPSEs en cuatro neuronas (57 %), en una (14 %) se produjo un incremento y en dos (29 %) no hubo cambios. Aunque esta variabilidad podría deberse a la segregación funcional de las NEMs de las vías directa e indirecta, esto solo podría demostrarse identificando el fenotipo de las neuronas registradas.

En nuestra búsqueda bibliográfica no encontramos reportes que evalúen el efecto de agonistas A2A sobre la transmisión corticoestriatal en animales depletados de dopamina. Nosotros encontramos que en las NEMs de ratas reserpinizadas la aplicación del agonista CGS 21680 disminuyó las CPSEs solamente en una neurona (17 %) mientras que en cinco (83 %) produjo un aumento. Esto último contrasta con la observación de que solo el 14% de las neuronas de ratas no reserpinizadas aumentaron sus CPSEs al ser expuestas al agonista A2A. Nuestros resultados concuerdan con los de un estudio realizado en ratas con lesión unilateral de la vía dopaminérgica con 6-OHDA, en el que la aplicación del agonista A2A, CGS 21680 (10 μ M) a través de una cánula de microdiálisis colocada en el estriado produjo un gran aumento en la liberación de glutamato (96). Tomados en conjunto, estos hallazgos sugieren que la ausencia de dopamina en el estriado de las ratas sensibiliza a los receptores de adenosina A2A para favorecer la liberación de glutamato de la vía corticoestriatal y aumentar excitabilidad de las NEMs (96).

Para determinar si el agonista A2A modula la transmisión sináptica corticoestriatal a nivel pre o postsináptico se analizó el cociente de pulso pareado (CPP) normalizado antes y después de aplicar el CGS 21680. Las modificaciones en el CPP durante la aplicación del CGS 21680 también presentaron mayor variabilidad en los registros procedentes de ratas no reserpinizadas; observándose que 3 neuronas presentaron un incremento en el CPP, en 2 hubo un decremento y 2 se mantuvieron sin cambios. Por el contrario, en las ratas reserpinizadas se observó que en 5 registros se redujo el CPP y en una sola neurona hubo un aumento, dando como resultado un cambio significativo comparado con la basal. Este hallazgo sugiere que el aumento de las CPSEs

causado por el agonista A2A en ausencia de dopamina podría deberse a la facilitación de la liberación de glutamato a nivel presináptico. Sin embargo, esto no necesariamente sería cierto puesto que las disminuciones del CPP también se han observado por modificaciones a nivel postsináptico.

En un estudio que evaluó el efecto de los antagonistas A2A en rebanadas con la innervación dopaminérgica intacta (49), se encontró que la aplicación de los antagonistas A2A, ZM 241385 (0.3-1 μ M) y ST1535 (10 μ M), por sí solos no modificaron la amplitud del PPSE inducidos por la estimulación corticoestriatal (49). Cabe señalar que este último estudio se hizo sin bloquear la transmisión GABAérgica intrínseca del estriado. En otro estudio realizado en rebanadas con la innervación intacta en presencia del antagonista GABA-A bicuculina en el medio extracelular y con fijación de voltaje a -80 mV, la aplicación del antagonista A2A, ZM 241385 (1 μ M), no modificó la amplitud de las CPSEs ni del PPSE inducidos por la estimulación de la vía corticoestriatal (51). En contraste, en el estudio realizado por Quiroz et al. (28), los registros se realizaron en animales con la innervación dopaminérgica intacta, con picrotoxina en el medio extracelular y fijando el voltaje a -70 mV, encontrando que la aplicación del antagonista A2A, SCH 442416 (1 μ M) produjo una disminución de las CPSEs en las NEMs de la vía directa, pero no en las de la vía indirecta, siendo estas últimas las que expresan una mayor densidad de receptores A2A en sus somas (97). En nuestro estudio se hicieron los registros electrofisiológicos bloqueando la entrada GABAérgica inhibitoria aplicando el fármaco picrotoxina en la solución intracelular y fijando el potencial de membrana a -60 mV, encontrando que en una neurona de ratas no reserpinizadas el antagonista A2A, ZM 241385 (100 nM), no modificó las CPSEs y en otra produjo un aumento, abriendo la posibilidad de que estas diferencias se deban a la segregación funcional de las NEMs. Sin embargo, las diferencias encontradas en nuestro estudio y con el de Quiroz et al (28), podrían deberse a que en este último se utilizaron ratones en etapa juvenil (20 a 30 días) mientras que en nuestro estudio fueron ratas en etapa adulta (2 a 4 meses); cuya edad es similar a la etapa en la que se presenta la

enfermedad de Parkinson en los humanos. De este modo, nuestros resultados podrían reflejar con mayor semejanza lo que ocurre realmente en los pacientes con Parkinson.

Por otro lado, tampoco encontramos estudios que hayan evaluado si los antagonistas A2A por sí solos son capaces de modular las CPSEs inducidas por estimulación corticoestriatal en NEMs de ratas con depleción de dopamina. En nuestros resultados se encontró que en las ratas reserpinizadas, al aplicar el antagonista ZM 241385 (100 nM), en 2 neuronas no se produjeron cambios en la amplitud de las CPSEs, en una neurona hubo un aumento y en otra una disminución. Aunque esta variabilidad también podría atribuirse a la segregación funcional de las NEMs, para probar esta hipótesis habría que realizar experimentos de marcaje para identificar el fenotipo de las neuronas registradas. Aquí cabe mencionar un reporte donde se evaluó el efecto el ZM 241385 y el ST1535 en ratas adultas con lesión de la vía dopaminérgica con 6-OHDA, encontrando que ambos antagonistas A2A potenciaron la acción inhibitoria del agonista dopaminérgico D2 quipirole (0.3 μ M) para reducir las CPSEs inducidas en las NEMs por estimulación corticoestriatal (51). Sin embargo, en este trabajo no se mencionó si los antagonistas A2A tienen efectos por sí solos.

Un hallazgo interesante del presente estudio es que en presencia del antagonista ZM 241385 (100 nM), la aplicación del CGS 21680 (5 μ M) a las NEMs de las ratas tratadas con reserpina produjo una disminución en la amplitud de las CPSEs en 2 de 4 neuronas registradas. Este efecto contrasta con la acción predominantemente facilitadora del agonista A2A aplicado solo en ausencia de dopamina. Por ello será importante realizar más experimentos para determinar si este efecto guarda relación con la segregación funcional de las NEMs y poder esclarecer si se debe a un cambio en la modulación pre o postsináptico de los receptores A2A después de interrumpir la transmisión dopaminérgica.

Cabe recalcar que gran parte de los estudios encontrados en donde se analiza el efecto de los agonistas y antagonistas de los receptores A1 y A2A se han realizado en

animales en etapa juvenil, mientras que en nuestro estudio se utilizaron animales adultos (2 a 4 meses), etapa en la que se presenta la enfermedad de Parkinson. Aunado a esto, solamente en el estudio realizado por Tozzi, et al. (51) se utilizaron ratas con denervación dopaminérgica a través de la lesión con 6-OHDA, mientras que en los otros estudios fueron animales con la innervación dopaminérgica intacta. De este modo, aunque nuestros resultados fueron diferentes con los encontrados en algunos estudios, reflejan con mayor certeza la modificación funcional de estos receptores en la etapa adulta y en condiciones patológicas cuando existe ausencia de dopamina, tal y como se presenta en la enfermedad de Parkinson.

De igual forma, durante los registros electrofisiológicos se fijó el voltaje de membrana de las NEMs a -60 mV con la finalidad de favorecer la activación de las NEMs tras la estimulación eléctrica. Gran parte de los estudios revisados no reportan el voltaje al cual se fijó el potencial de membrana durante los registros intracelulares; los que sí lo reportan utilizan un voltaje de -70 a -80 mV, valor en el que las NEMs se encuentran en el estado de reposo (hiperpolarizado). Puesto que el potencial de membrana puede modificar el estado de inactivación de diversos tipos de canales iónicos, cabe la posibilidad de que las diferencias entre los resultados de estudios previos y los del presente trabajo se hayan debido a las diferencias del voltaje de fijación empleados para hacer los registros de corrientes. Por tal motivo, se sugiere realizar más registros electrofisiológicos en ambos estados de excitabilidad (estado “down” y estado “up”), para determinar si la acción moduladora de los receptores A1 y A2A se modifica en ambas situaciones y de este modo tener un panorama más amplio de la función de estos receptores en condiciones normales y en ausencia de dopamina.

En resumen, los hallazgos encontrados en nuestros experimentos sugieren que tras la depleción de dopamina en el estriado, se favorece la activación de los receptores de adenosina A1 y A2A, principalmente a nivel presináptico (ver Fig. 40), modificando la modulación de la transmisión glutamatérgica de la vía corticoestriatal. La activación de los receptores A1 en nuestras condiciones experimentales reduce la probabilidad de

liberación del glutamato al espacio sináptico; mientras que los receptores A2A la favorecen, dando lugar a una perturbación en las funciones del circuito motor que, en última instancia, interfiere con la coordinación de los diversos conjuntos de músculos produciendo los síntomas característicos de la enfermedad de Parkinson. Por tal motivo, nuestros resultados brindan mayor información de lo que podría estar pasando con el funcionamiento de los receptores A1 y A2A en el circuito motor extrapiramidal de los pacientes con enfermedad de Parkinson, permitiendo indagar sobre posibles alternativas farmacológicas que contribuyan a disminuir los síntomas y manifestaciones de dicha enfermedad. Sin embargo, aún hacen falta realizar más investigaciones para comprender el efecto de los antagonistas de los receptores de adenosina de tipo A1 y A2A sobre la modulación de la función del circuito motor en ausencia de dopamina.

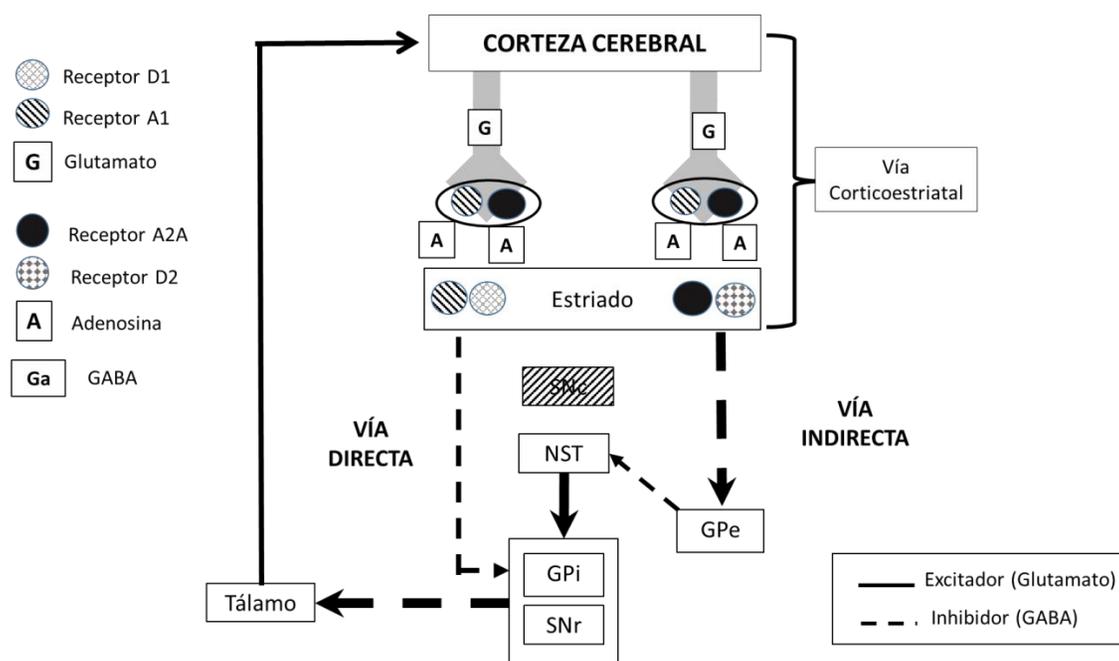


Figura 40. Circuito motor de los ganglios basales en la Enfermedad de Parkinson. SNC: sustancia nigra pars compacta; NST: núcleo subtalámico; GPe: globo pálido externo; GPi: globo pálido interno; SNr: sustancia nigra pars reticulata. (Modificado de la referencia 1 y 4). Los círculos con contorno negro indican los hallazgos encontrados en este trabajo tras la aplicación de los agonistas de los receptores A1 y A2A.

10. CONCLUSIONES

1. Se estandarizó el modelo de parkinsonismo con el fármaco reserpina para la realización de registros electrofisiológicos en las NEMs del estriado de ratas adultas (2 a 4 meses de edad).
2. Se mostró en los mismos grupos de animales el curso temporal de la adipisia, anorexia y pérdida de peso inducidos por el esquema de reserpina: 5 mg/kg en el día 0 y 2 mg/kg en los días 2 y 4.
3. Se encontró que, con este esquema de reserpina, en el quinto día de tratamiento se produce en promedio un decremento del 32.6 % de peso, el cual fue reducido al 22 % con la administración de una alimentación intragástrica hipercalórica.
4. Se encontró que a partir de los 90 minutos posteriores a la primera inyección de reserpina se produjo un síndrome de inmovilidad y rigidez (catalepsia) en los animales, el cual perduró hasta el quinto día y no fue modificado por la alimentación intragástrica.
5. La estimulación de los receptores A1 con el agonista selectivo CCPA (300 nM) produjo una disminución en la amplitud de las CPSEs en los animales no reserpinizados y reserpinizados, observando una tendencia, no significativa, a producir el efecto con mayor rapidez y magnitud en las ratas con depleción de dopamina.
6. La estimulación de los receptores A1 con el CCPA (300 nM) produjo un aumento significativo en el cociente de pulso pareado (CPP) solo en las NEMs de ratas tratadas con reserpina, sugiriendo que la depleción de dopamina favorece la inhibición presináptica de la liberación de glutamato ejercida a través de los receptores A1.
7. Por sí solo el antagonista A1, DPCPX (100 nM), no modifica la amplitud de las CPSEs en las ratas no reserpinizadas, mientras que en los animales reserpinizados aún no se tienen suficientes registros para evaluar su efecto.
8. La estimulación de los receptores A2A con el agonista selectivo CGS 21680 (5 μ M) produjo un aumento significativo en la amplitud de las CPSEs en las NEMs de ratas reserpinizadas, que se asoció con una disminución significativa en el CPP, sugiriendo que la depleción de dopamina favorece la actividad de los receptores A2A a nivel presináptico para aumentar la liberación de glutamato.

9. La estimulación de los receptores A2A en las NEMs de ratas no reserpinizadas produjo efectos más variables en la amplitud de las CPSEs, causando aumento en una neurona, disminución en 4 y ningún cambio en 2 neuronas.

11. SUGERENCIAS PARA FUTURAS INVESTIGACIONES

1. Se recomienda efectuar mediciones de los niveles de dopamina en el estriado de las ratas durante todo el esquema farmacológico de reserpina para corroborar que la inmovilidad y rigidez de los animales se debe a la depleción de dopamina en el estriado.
2. Se requieren hacer más registros electrofisiológicos para evaluar el efecto de los agonistas de los receptores A1 y A2A, en presencia de sus respectivos antagonistas, sobre la transmisión glutamatérgica de la vía corticoestriatal.
3. Se recomienda realizar estudios de inmunohistoquímica con marcadores que permitan identificar si las NEMs analizadas durante los registros electrofisiológicos son de la vía directa o la indirecta.
4. Evaluar el efecto en la transmisión glutamatérgica de la vía corticoestriatal con la aplicación simultánea de antagonistas de los receptores A1 y A2A.
5. Evaluar el efecto de la cafeína y la teofilina sobre la transmisión corticoestriatal en ausencia y presencia de dopamina, para determinar si la modulación presináptica de la liberación de glutamato participa en sus efectos terapéuticos reportados en la enfermedad de Parkinson.

12. REFERENCIAS

1. Blandini F, Nappi G, Tassorelli C, Martignoni E. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, 2000; 62: 63-88.
2. Surmeier DJ, Carrillo-Reid L, Bargas J. Dopaminergic modulation of striatal neurons, circuits, and assemblies. *Neuroscience*. 2011; 198: 3-18.
3. Oikonomou KD, Singh MB, Sterjanaj EV, Antic SD. Spiny neurons of amygdala, striatum, and cortex use dendritic plateau potentials to detect network UP states. *Front Cell Neurosci*. 2014; 8: 292.
4. Obeso J, Rodríguez-Oroz M, Benitez-Temino B, Blesa F, Guridi J, Marin C, et al. Functional Organization of the Basal Ganglia: Therapeutic Implications for Parkinson's Disease. *Mov Disord*. 2008; 23: S548–S559.
5. Fuxe K, Ferré S, Zoli M, Agnati LF. Integrated events in central dopamine transmission as analyzed at multiple levels. Evidence for intramembrane adenosine A2A/dopamine D2 and adenosine A1/dopamine D1 receptor interactions in the basal ganglia. *Brain Res Brain Res Rev*. 1998; 26: 258-73.
6. Franco R, Lluís C, Canela EI, Mallol J, Agnati L, et al. Receptor-receptor interactions involving adenosine A1 or dopamine D1 receptors and accessory proteins. *J Neural Transm*. 2007; 114: 93-104.
7. Ferré S, Ciruela F, Borycz J, Solinas M, Quarta D, et al. Adenosine A1-A2A receptor heteromers: new targets for caffeine in the brain. *Front Biosci*. 2008;13: 2391-9.
8. Ferré S, Agnati LF, Ciruela F, Lluís C, Woods AS, et al. Neurotransmitter receptor heteromers and their integrative role in 'local modules': the striatal spine module. *Brain Res Rev*. 2007; 55: 55-67.
9. Kitagawa M, Houzen H, Tashiro K. Effects of caffeine on the freezing of gait in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2007; 22: 710-2.
10. Alisky J. Coffee as an anti-parkinsonian agent: a case report. *J Altern Complement Med*. 2008; 14: 897.
11. Postuma RB, Lang AE, Munhoz RP, Charland K, Pelletier A, Moscovich M, Filla L, Zanatta D, Rios Romenets S, Altman R, Chuang R, Shah B. Caffeine for treatment of Parkinson disease: a randomized controlled trial. *Neurology*. 2012; 79: 651-8.
12. Bednark JG, Campbell ME, Cunnington R. Basal ganglia and cortical networks for sequential ordering and rhythm of complex movements. *Front Hum Neurosci*. 2015; 9: 421

13. Ferré S, Fredholm BB, Morelli M, Popoli P, Fuxe K. Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends Neurosci.* 1997; 20: 482-7.
14. Villalba RM, Lee H, Smith Y. Dopaminergic denervation and spine loss in the striatum of MPTP-treated monkeys. *Exp Neurol.* 2009; 215: 220-7.
15. Gerfen CR, Surmeier DJ. Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annu Rev Neurosci.* 2011; 34: 441-66.
16. Gerfen CR. The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. *Trends Neurosci.* 1992; 15: 133-9.
17. Surmeier DJ, Ding J, Day M, Wang Z, Shen W. D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends Neurosci.* 2007; 30: 228-35.
18. Stern EA, Kincaid AE, Wilson CJ. Spontaneous subthreshold membrane potential fluctuations and action potential variability of rat corticostriatal and striatal neurons in vivo. *J Neurophysiol.* 1997; 77: 1697-715.
19. Ciruela F, Casado V, Rodrigues RJ, Luján R, Burguen J, Canals M, et al. Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A1–A2A receptor heteromers. *J Neurosci.* 2006; 26: 2080–2087.
20. Pak MA, Yetkin Y. The sources of extracellular adenosine in hippocampus and neostriatum of the rat brain. *World Journal of Neuroscience.* 2014; 4: 85-91.
21. Fuxe K, Ferré S, Genedani S, Franco R, Agnati LF. Adenosine receptor-dopamine receptor interactions in the basal ganglia and their relevance for brain function. *Physiol Behav.* 2007; 92: 210-217.
22. Bahena-Trujillo R, Flores G, Arias-Montaña JA. Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Rev Biomed.* 2000, 11: 39-60.
23. Carriba P. Heteromerización de receptores de adenosina A2A, Dopamina D2 y Cannabinoides CB1. Implicaciones farmacológicas y funcionales. Tesis doctoral. Universitat de Barcelona, Facultat de Biologia, Departament de Bioquímica I Biologia Molecular. Enero de 2007.
24. Fisone G, Håkansson K, Borgkvist A, Santini E. Signaling in the basal ganglia: postsynaptic and presynaptic mechanisms. *Physiol Behav.* 2007; 92: 8-14.

25. Zuccato C, Valenza M, Cattaneo E. Molecular mechanisms and potential therapeutical targets in Huntington's disease. *Physiol Rev.* 2010; 90: 905-981.
26. Ferré S. An update on the mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine. *J Neurochem.* 2008; 105: 1067-79.
27. Góngora-Alfaro JL, Álvarez-Cervera FJ, Bata-García JL. Chapter 81. Caffeine consumption and prevention of cognitive decline: a focus on mechanisms. En: *Diet and Nutrition in Dementia and Cognitive Decline.* Martin CR, Prredy VR (Eds). Academic Press, Elsevier. 2015: 879-889.
28. Quiroz C, Luján R, Uchigashima M, Simoes AP, Lerner TN, Borycz J, et al. Key modulatory role of presynaptic adenosine A2A receptors in cortical neurotransmission to the striatal direct pathway. *Scientific World Journal.* 2009; 9: 1321–1344.
29. Shen HY, Canas PM, Garcia-Sanz P, Lan JQ, Boison D, Moratalla R, et al. Adenosine A2A receptors in striatal glutamatergic terminals and GABAergic neurons oppositely modulate psychostimulant action and DARPP-32 phosphorylation. *PLOS One.* 2013; 8: 1-11.
30. Haas HL, Selbach O Functions of neuronal adenosine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2000; 362: 375-381.
31. Rodrigues RJ, Alfaro TM, Rebola N, Oliveira CR, Cunha RA. Co-localization and functional interaction between adenosine A2A and metabotropic group 5 receptors in glutamatergic nerve terminals of the rat striatum. *J Neurochem.* 2005; 92: 433–441.
32. Ferré S, O'Connor WT, Svenningsson P, Bjorklund L, Lindberg J, Tinner B, et al. Dopamine D1 receptor-mediated facilitation of GABAergic neurotransmission in the rat strioentopenduncular pathway and its modulation by adenosine A1 receptor-mediated mechanisms. *Eur J Neurosci.* 1996; 8: 1545-1553.
33. Hernández-López S, Tkatch T, Pérez-Garci E, Galarraga E, Bargas J, Hamm H, Surmeier DJ. D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca²⁺ currents and excitability via a novel PLCβ1-IP3-calcineurin-signaling cascade. *J Neurosci.* 2000; 20: 8987-8995.
34. Simola N, Morelli M, Pinna A. Adenosine A2A receptor antagonists and Parkinson's disease: State of the art and future directions. *Curr Pharm Des.* 2008; 14: 1475-1489.
35. Azdad K, Gall D, Woods AS, Ledent C, Ferré S, Schiffmann SN. Dopamine D2 and adenosine A2A receptors regulate NMDA-mediated excitation in accumbens neurons through A2A-D2 receptor heteromerization. *Neuropsychopharmacology.* 2009; 34: 972-986.

36. Gilman S. *Neurobiology of Disease*. United States: Elsevier Academic Press; 2007. ISBN-13: 978-0-12-088592-3
37. Truong DD, Bhidayasiri R, Wolters E. Management of non-motor symptoms in advanced Parkinson disease. *JNeurol Sci*. 2008; 266: 216–228.
38. Marjama-Lyons J, Lieberman A. *Medicamentos para la enfermedad de Parkinson*. 3ra edición. Fundación Nacional de Parkinson. Estados Unidos.
39. Grupo MBE Galicia. *Enfermedad de Parkinson. Guías clínicas*, 2006; 6(23). Consultado: 19-septiembre-2014.
Disponibile en: http://www.oocities.org/vivien_87/Parkinson_I.pdf
40. Pinna A. Adenosine A2A receptor antagonists in Parkinson's disease: progress in clinical trials from the newly approved istradefylline to drugs in early development and those already discontinued. *CNS Drugs*. 2014; 28: 455-474.
41. Schapira A, Bezard E, Brotchie J, Calon F, Collingridge GL, Ferger B, et al. Novel pharmacological targets for the treatment of Parkinson's disease. *Nat Rev Drug Discov*. 2008; 5: 845-854.
42. Shook B, Rassnick S, Wallace N, Crooke J, Ault M, Chakravarty D, et al. Design and characterization of optimized adenosine A2A/A1 receptor antagonists for the treatment of Parkinson's disease. *J Med Chem*. 2012; 55: 1402–1417.
43. Malenka RC, Kocsis JD. Presynaptic actions of carbachol and adenosine on corticostriatal synaptic transmission studied in vitro. *J Neurosci*. 1988; 8: 3750-3756.
44. Lovinger DM, Choi S. Activation of adenosine A1 receptors initiates short-term synaptic depression in rat striatum. *Neurosci Lett*. 1995; 199: 9-12.
45. Calabresi P, Centonze D, Pisani A, Bernardi G. Endogenous adenosine mediates the presynaptic inhibition induced by aglycemia at corticostriatal synapses. *J Neurosci*. 1997; 17: 4509–4516.
46. Flagmeyer I, Haas HL, Stevens DR. Adenosine A1 receptor-mediated depression of corticostriatal and thalamostriatal glutamatergic synaptic potentials in vitro. *Brain Res*. 1997; 778: 178–185.
47. Schotanus SM, Fredholm B, Chergui K. NMDA depresses glutamatergic synaptic transmission in the striatum through the activation of adenosine A1 receptors: Evidence from knockout mice. *Neuropharmacology*. 2006; 51: 272-282.
48. Chen C, Regehr WG. Contributions of residual calcium to fast synaptic transmission. *J Neurosci*. 1999; 19: 6257-66.

49. Tozzi A, Tschertter A, Belcastro V, Tantucci M, Costa C, Picconi B, et al. Interaction of A2A adenosine and D2 dopamine receptors modulates corticostriatal glutamatergic transmission. *Neuropharmacology*. 2007; 53: 783-789.
50. Martire A, Tebano MT, Chiodi V, Ferreira S, Cunha R, Köfalvi A, et al. Pre-synaptic adenosine A2A receptors control cannabinoid B1 receptor-mediated inhibition of striatal glutamatergic neurotransmission. *J Neurochem*. 2011; 116: 273–280.
51. Tozzi A, Iure A, Di Filippo M, Tantucci M, Costa C, Borsini F, et al. The distinct role of medium spiny neurons and cholinergic interneurons in the D2/A2A receptor interaction in the striatum: Implications for Parkinson's disease. *J Neurosci*. 2011; 31: 1850–1862.
52. Lerner TN, Horne EA, Stella N, Kreitzer AC. Endocannabinoid Signaling Mediates Psychomotor Activation by Adenosine A2A Antagonists. *J Neurosci*. 2010; 30: 2160 – 2164.
53. Kaasinen V, Ruottinen HM, Någren K, Lehtikoinen P, Oikonen V, Rinne JO. Upregulation of putaminal dopamine D2 receptors in early Parkinson's disease: a comparative PET study with [¹¹C] raclopride and [¹¹C]N-methylspiperone. *J Nucl Med*. 2000; 41:65-70.
54. Varani K, Vincenzi F, Tosi A, Gessi S, Casetta I, Granieri G, Fazio P, Leung E, MacLennan S, Granieri E, Borea PA. A2A adenosine receptor overexpression and functionality, as well as TNF-alpha levels, correlate with motor symptoms in Parkinson's disease. *FASEB J*. 2010; 24: 587-598.
55. Wardas J. Synergistic effect of SCH 58261, an adenosine A2A receptor antagonist, and L-DOPA on the reserpine-induced muscle rigidity in rats. *Pol J. Pharmacol*. 2003; 55: 155–164.
56. Altman RD, Lang AE, Postuma RB. Caffeine in Parkinson's disease: A pilot open-label, dose-escalation study. *Mov Disord*. 2011; 26: 2427-2431.
57. Bata-García JL, Tun-Cobá L, Alvarez-Cervera FJ, Villanueva-Toledo JR, Heredia-López FJ, Góngora-Alfaro JL. Improvement of postural adjustment steps in hemiparkinsonian rats chronically treated with caffeine is mediated by concurrent blockade of A1 and A2A adenosine receptors. *Neuroscience*. 2010; 166: 590-603.
58. Gerlach M, Foley P, Riederer P. The relevance of preclinical studies for the treatment of Parkinson's disease. *J Neurol*. 2003; 250: I31–I34.

59. Mishina M, Ishiwata K, Naganawa M, Kimura Y, Kitamura S, Suzuki M, et al. Adenosine A2A receptors measured with [¹¹C]TMSX PET in the striata of Parkinson's disease patients. *PLOS One*. 2011; 6: 1-8.
60. Rivera-Oliver M, Díaz-Ríos M. Using caffeine and other adenosine receptor antagonists and agonists as therapeutic tools against neurodegenerative diseases: A review. *Life Sci*. 2014; 101: 1-9.
61. Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ Jr, Sibley DR. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science*. 1990; 250: 1429-32.
62. Gerfen CR, McGinty JF, Young WS 3rd. Dopamine differentially regulates dynorphin, substance P, and enkephalin expression in striatal neurons: in situ hybridization histochemical analysis. *J Neurosci*. 1991; 11: 1016-1031.
63. Gerfen CR. Dopamine-mediated gene regulation in models of Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2000; 47 (4 Suppl 1): S42-50; discussion S50-52.
64. Harrison MB, Kumar S, Hubbard CA, Trugman JM. Early changes in neuropeptide mRNA expression in the striatum following reserpine treatment. *Exp Neurol*. 2001; 167: 321-328.
65. Joyce J. Differential response of striatal dopamine and muscarinic cholinergic receptor subtypes to the loss of dopamine. *Exp Neurol*. 1991; 113: 277-290.
66. Metzger RR, Brown JM, Sandoval V, Rau KS, Elwan MA, Miller GW, et al. Inhibitory effect of reserpine on dopamine transporter function. *Eur J Pharmacol*. 2002; 456: 39-43.
67. Leão AH, Sarmiento-Silva AJ, Santos JR, Ribeiro AM, Silva RH. Molecular, neurochemical, and behavioral hallmarks of reserpine as a model for Parkinson's disease: new perspectives to a long-standing model. *Brain Pathol*. 2015; 25: 377-390.
68. Trugman JM, James CL. Rapid development of dopaminergic supersensitivity in reserpine-treated rats demonstrated with ¹⁴C-2-Deoxyglucose autoradiography. *J Neurosci*. 1992; 12: 2875-2879.
69. Mocchetti I, Guidotti A, Schwartz JP, Costa E. Reserpine changes the dynamic state of enkephalin stores in rat striatum and adrenal medulla by different mechanisms. *J Neurosci*. 1985; 5: 3379-3385.
70. Jaber M, Fournier MC, Bloch B. Reserpine treatment stimulates enkephalin and D2 dopamine receptor gene expression in the rat striatum. *Mol Brain Res*. 1992; 15: 189-194.

71. Szasz G, Budvari-Barany Z. *Pharmaceutical Chemistry of Antihypertensive Agents*. Volume 1, CRC Press; 1990, pp. 139-163.
72. Martin Del Valle EM. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*. 2004; 39: 1033-1046.
73. Halaris AE, Freedman DX. Loss of body weight as a predictor of reserpine-induced amine depletion. *Eur J Pharmacol*. 1975; 32: 93-101.
74. Fan J, Wu L, Li G, Tao S, Sheng Z, et al. Effects of enteral nutrition with parenteral glutamine supplementation on the immunological function in septic rats. *Br J Nutr*. 2015; 113: 1712-1722.
75. Martins PJF, Azzalis LA, Oliveira AC, Fernandes L, Tufik S, et al. Effects of chow and liquid diet on liver integrity and antioxidant defense in sleep-deprived male rats. *J Nutr Food Sci*. 2013; 3: 5.
76. Nebendahl K. Routes of Administration. En: Chapter 24: The laboratory rat, handbook of experimental animals. Krinke GJ (Ed.). Academic Press, Elsevier. 2000, pp. 463-483.
77. Moo-Puc RE, Góngora-Alfaro JL, Alvarez-Cervera FJ, Pineda JC, Arankowsky-Sandoval G, Heredia-López F. Caffeine and muscarinic antagonists act in synergy to inhibit haloperidol-induced catalepsy. *Neuropharmacology*. 2003; 45: 493-503.
78. Góngora-Alfaro JL, Moo-Puc RE, Villanueva-Toledo JR, Alvarez-Cervera FJ, Bata-García JL, et al. Long-lasting resistance to haloperidol-induced catalepsy in male rats chronically treated with caffeine. *Neurosci Lett*. 2009; 463: 210-4.
79. Góngora-Alfaro JL, Hernández-López S, Flores-Hernández J, Galarraga E. Firing frequency modulation of substantia nigra reticulata neurons by 5-hydroxytryptamine. *Neurosci Res*. 1997; 29: 225-231.
80. Sullivan MA, Chen H, Morikawa H. Recurrent inhibitory network among striatal cholinergic interneurons. *J Neurosci*. 2008; 28: 8682-90.
81. Torres JL. Modulación por GABA y serotonina de la plasticidad sináptica de corto plazo en la capa 2/3 de la corteza somato sensorial de la rata. Tesis de Doctorado en Farmacología. Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias de la Salud. Guadalajara, Jalisco, 2005.
82. Salgado H, Köhr G, Treviño M. Noradrenergic 'tone' determines dichotomous control of cortical spike-timing-dependent plasticity. *Sci Rep*. 2012; 2: 417.

83. Ogden D, Stanfield P. Capítulo 4. Patch clamp techniques for single channel and whole-cell recording. En: Patch Clamp Techniques. pp 53-78.
84. Mikhail A, Fischer C, Patel A, Long MA, Limberis JT, Martin RL, Cox BF, Gintant GA, Su Z. Hydroxypropyl beta-cyclodextrins: a misleading vehicle for the in vitro hERG current assay. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2007; 49: 269-274.
85. Lohse MJ, Klotz KN, Schwabe U, Cristalli G, Vittori S, Grifantini M. 2-Chloro-N⁶-cyclopentyladenosine: a highly selective agonist at A1 adenosine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1988; 337: 687-689.
86. Fredholm BB, Lindström K. Autoradiographic comparison of the potency of several structurally unrelated adenosine receptor antagonists at adenosine A1 and A2A receptors. *Eur J Pharmacol*. 1999; 380: 197-202.
87. Hutchison AJ, Webb RL, Oei HH, Ghai GR, Zimmerman MB, Williams M. CGS 21680C, an A2 selective adenosine receptor agonist with preferential hypotensive activity. *J Pharmacol Exp Ther*. 1989; 251: 47-55.
88. Fredholm BB, Ijzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev*. 2001; 53: 527-552.
89. Daniel WW, Cross CL. *Biostatistics. A foundation for analysis in the health sciences*. Tenth edition. Wiley. USA, 2013. 958 pp.
90. Ungerstedt U. Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol Scand. Suppl*. 1971; 367: 95-122.
91. Fernandes VS, Santos JR, Leão AH, Medeiros AM, Melo TG, et al. Repeated treatment with a low dose of reserpine as a progressive model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res*. 2012; 231: 154-63.
92. Sakai K, Gash DM. Effect of bilateral 6-OHDA lesions of the substantia nigra on locomotor activity in the rat. *Brain Res*. 1994; 633: 144-50.
93. Ferro MM, Bellissimo MI, Anselmo-Franci JA, Angellucci ME, Canteras NS, et al. Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: histological, neurochemical, motor and memory alterations. *J Neurosci Methods*. 2005; 148: 78-87.
94. Patil RA, Hiray YA, Kasture SB. Reversal of reserpine-induced orofacial dyskinesia and catalepsy by *Nardostachys jatamansi*. *Indian J Pharmacol*. 2012; 44: 340-344.

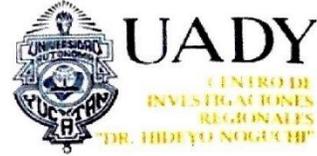
95. Klein A, Schmidt WJ. Catalepsy intensifies context-dependently irrespective of whether it is induced by intermittent or chronic dopamine deficiency. *Behav Pharmacol.* 2003; 14: 49-53.

96. Tanganelli S, Sandager Nielsen K, Ferraro L, Antonelli T, Kehr J, Franco R, Ferré S, Agnati LF, Fuxe K, Scheel-Krüger J. Striatal plasticity at the network level. Focus on adenosine A2A and D2 interactions in models of Parkinson's Disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2004; 10: 273-280.

97. Schiffmann SN, Fisone G, Moresco R, Cunha RA, Ferré S. Adenosine A2A receptors and basal ganglia physiology. *Prog Neurobiol.* 2007; 83: 277-292.

13. ANEXO 1

COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN



Mérida, Yuc., a 24 de agosto de 2015

DICTAMEN			
1ª REVISIÓN	FECHA: 24/08/15	CEI/13/15	PROTOCOLO: INVESTIGACIÓN
TÍTULO	Estudio del impacto de la depleción dopaminérgica estriatal sobre la acción moduladora de los receptores de adenosina A1 y A2A en la plasticidad sináptica de la vía corticoestriatal..		
RESPONSABLES:	Dra. José Luis Góngora Alfaro		
Adscripción			
DONDE SE REALIZARÁ EL ESTUDIO:	Laboratorio de Neurofisiología, Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi"		
Teléfonos: 924-6412, ext 1174	Correo-e:	galfaro@correo.uady.mx	
Observaciones acerca del protocolo			

1. Cumple con los requisitos.

RECOMENDACIONES

Informe al Comité de Ética en Investigación cada año de los avances
Entregar informe de proyecto finalizado

DICTAMEN: APROBADO

Atentamente


Fernando Isaias Puerto Manzano
VOCAL PRESIDENTE


Francisco Javier Escobedo Ortegón
VOCAL SECRETARIO