



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

Departamento de Farmacología

**“Expresión y funcionalidad de adenilato ciclasa V en ratas bajo un
tratamiento crónico con anfetamina”**

TESIS

Que presenta

Biol. Dulce Gabriela Melchor García

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA

Director de la Tesis:

Dr. Benjamín Florán Garduño

México, DF.

Diciembre, 2015

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional en el Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias bajo la tutoría del Dr. Benjamín Florán Garduño, con apoyo del CONACYT a través de la beca con número de registro 204426.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar deseo expresar mi agradecimiento a mi director de tesis, Dr. Benjamín Florán Garduño, por la dedicación y apoyo que me ha brindado en este trabajo. Gracias por la confianza ofrecida desde que llegué a su laboratotio y por su gran amistad.

A la Doctora Claudia Pérez Cruz y al Doctor Hernán Cortés Callejas por los buenos consejos y por todo el apoyo que me brindaron en este proyecto, por su orientación y atención a mis dudas.

A mis compañeros de Laboratorio quienes con su apoyo y consejos he llegado a culminar otra de mis grandes metas. Un agradecimiento a los Auxiliares y Técnicos por su apoyo en el uso de equipos y materiales, en especial al Dr. Arturo Ávalos Fuentes por toda su ayuda académica.

A todos mis amigos de Maestría y Generación por hacer mi estancia más agradable, porque siempre me han prestado un gran apoyo moral y humano. Mis más sinceros agradecimientos a mi Pepillo por estar ahí cuando más lo eh necesitado, por haber compartido conmigo momentos inolvidables y por darme todos los ánimos para salir adelante, gracias por todo su cariño.

A mi familia...

Sabiendo que jamás encontraré alguna manera para expresarles todo mi agradecimiento por su constante apoyo, confianza y sobre todo cariño, espero que siempre tengan en mente que cada uno de mis ideales, logros y esfuerzos también han sido suyos e inspirados en ustedes. Cada minuto que pasa siempre agradezco a la vida por haberme dado a unos excelentes padres como ustedes. Gracias Eugenio Melchor Mota y Yolanda García Hernández por estar siempre conmigo.

A mi Hermano Daniel Alejandro Melchor García por nunca dejarme sola en cada locura que hago, por siempre brindarme su apoyo moral hasta el final.

A mi tía Male, a mi mamá Peche y a mi mamá Tocha porque a pesar de la distancia cada palabra de aliento que me brindan, siempre hacen que me sienta cerca de casa, por su gran cariño y confianza que siempre me han brindaron, gracias por darme la fuerza para irme superando.

A mis tíos y primos por el apoyo recibido durante mi formación profesional.

Infinitamente agradezco a todos ustedes que siempre velaron por mi desde niño y que me impulsaron a seguir siempre adelante aun cuando tuve algunas dudas y tropiezos. Hoy también gracias a ustedes me lleno de orgullo al dedicarles esta realidad tan hermosa que me han permitido alcanzar; la conquista de esta meta. Mi formación profesional.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	9
CAPÍTULO 1: SISTEMA DOPAMINÉRGICO	9
<i>Síntesis y liberación de Dopamina</i>	9
<i>Receptores a dopamina y señalización</i>	11
<i>Expresión de Receptores Dopaminérgicos</i>	12
<i>Farmacología</i>	13
CAPÍTULO 2: ADENILATO CICLASA	15
<i>Función</i>	15
<i>Estructura</i>	16
<i>Clasificación y Localización</i>	18
<i>Adenilato Ciclasa 5</i>	19
CAPÍTULO 3: LA AC5 EN LA FUNCIÓN DOPAMINÉRGICA	20
ANTECEDENTES INMEDIATOS	25
HIPÓTESIS	27
OBJETIVO GENERAL	27
OBJETIVOS PARTICULARES	27
MATERIAL Y MÉTODOS	28
DETERMINACIÓN DE [³ H]-AMPC EN REBANADAS.....	29
WESTERN BLOT.....	30
LIBERACIÓN DE [³ H]-GABA.....	30
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	31
RESULTADOS	32
EL PRIMING CON AMPH INCREMENTÓ LA ACTIVIDAD MOTORA.....	32
EL TRATAMIENTO CRÓNICO CON AMPH INCREMENTÓ LA ACTIVIDAD DE AC5 EN EL NACC.....	33
EL TRATAMIENTO CRÓNICO CON AMPH INCREMENTÓ LA EXPRESIÓN DE AC5 EN EL NACC Y EN EL ESTRIADO.....	34
AMPH INCREMENTÓ LA LIBERACIÓN DE [³ H]-GABA BAJO ESTIMULACIÓN DEL RECEPTOR D1 CON SKF38393.....	37
DISCUSIÓN	39
CONCLUSIONES	44
BIBLIOGRAFÍA	45

RESUMEN

La administración crónica de L-DOPA en pacientes con Enfermedad de Parkinson produce movimientos involuntarios anormales (discinesias) asociados a hiperactividad de la adenilato ciclasa y aumento de la expresión de FosB y Δ FosB. La administración de drogas de abuso dopaminérgicas también aumenta la expresión de estos genes, sugiriendo mecanismos similares mediados por ambos fármacos. En este trabajo quisimos ver si el tratamiento crónico con anfetaminas también produce estos cambios sobre la adenilato ciclasa en el núcleo accumbens, donde se integran los procesos motivacionales de recompensa y las adicciones y en el estriado como un centro de integración sensorimotor.

Realizamos experimentos de administración crónica de anfetamina (1 mgr/kg de peso) en ratas de la cepa Wistar de 200-250 grs. por 5 días, también se realizó un reto farmacológico con la misma dosis de anfetamina tres días después del tratamiento. Posterior al sacrificio, estudiamos la expresión de adenilato ciclasa 5 por medio de western blot en homogenizados, también realizamos estudios de formación de AMPc y liberación de GABA radioactivo, estimulando la adenilato ciclasa con forskolina y a los receptores D1 con SKF23390. Encontramos incrementos significativos de la expresión de adenilato ciclasa 5 a los 5 días de administración de anfetamina, comparados con el grupo que solo recibió solución salina. El reto farmacológico mostró que la expresión aumento aún más. De manera interesante existe una correlación entre los incrementos de la proteína con la formación de AMPc estimulada por forskolina y la liberación de GABA estimulada con agonistas al receptor D1 (SKF23390).

Estos datos sugieren que la administración de anfetamina en animales normales al igual que la L-DOPA en modelos de animales con enfermedad de Parkinson supersensibiliza la actividad y aumenta la expresión de la adenilato ciclasa 5. También explican por qué el uso de fármacos que activan receptores metabotrópicos que inhiben la actividad de adenilato ciclasa son útiles para el tratamiento de adicciones lo mismo que para la discinesia inducida por L-DOPA.

ABSTRACT

Chronic administration of L-dopa in patients with PD produces abnormal involuntary movements (dyskinesias) associated with hyperactivity of adenylyl cyclase and increased expression of FosB and Δ FosB. Administration of dopaminergic drug abuse also increases the expression of these genes, suggesting similar mechanisms mediated by both drugs. In this paper we wanted to see if chronic amphetamine treatment also produces these changes on adenylyl cyclase in accumbens nucleus, where the motivational reward processes and addiction are integrated and striatum sensorimotor integration center.

We conducted experiments chronic administration of amphetamine (1 mg / kg) in rats Wistar 200-250 g. for 5 days, a pharmacological challenge with the same dose of amphetamine three days after treatment. After the sacrifice, we studied the expression of adenylyl cyclase 5 by western blot in homogenates, we also perform studies of cAMP formation and release of radioactive GABA, stimulating adenylyl cyclase with forskolin and D1 receptors with SKF23390. We found significant increases in the expression of adenylyl cyclase 5 to 5 days of administration of amphetamine, compared with the group that received only saline. Pharmacological challenge showed that further increase expression. Interestingly a correlation between the protein increases with the formation of forskolin-stimulated cAMP and GABA release stimulated with the D1 receptor agonists (SKF23390).

These data suggest that administration of amphetamine in normal animals as well as the L-DOPA in animal models of disease Parkinson supersensibiliza activity and increases the expression of adenylyl cyclase 5 also explain why the use of drugs that activate receptors metabotropic inhibiting adenylyl cyclase activity are useful for the treatment of addiction as well as for dyskinesia induced by L-DOPA.

ABREVIATURAS

6-OHDA	6-Hidroxidopamina
AADC	Descarboxilasa de aminoácidos aromáticos
AC	Adenilato cilasa
AMPc	Adenosín 3,5-monofosfato
AMPH	Anfetamina
ATP	Adenosín Trifosfato
CaM	Calmodulina
CTX	Toxina del cólera
EP	Enfermedad de Parkinson
FDFM	Discinesia familiar con mioquimia facial
FSK	Forskolina
GABA	Ácido γ -aminobutírico
HCL	Ácido Clorhídrico
hPAH	Fenilalanina hidroxilasa
L-DOPA	3,4-dihidroxifenil-L-alanina
MNS	Neuronas espinosas medianas
NAcc	Núcleo accumbens
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PTX	Toxina pertussis
sAC	Adenilato ciclasa soluble
SN	Sustancia negra
SNr	Sustancia negra pars reticulata
TCA	Ácido tricloroacético
TH	Tirosina hidroxilasa
AADC	Descarboxilasa de aminoácidos aromáticos

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1: SISTEMA DOPAMINÉRGICO

La Dopamina es un neuromodulador catecolaminérgico predominante en los mamíferos, donde controla una variedad de funciones. Cuatro estructuras anatómicas en el cerebro de los mamíferos que contienen grupos celulares y proveen inervación dopaminérgica han sido identificadas; la vía nigroestriatal y los sistemas mesocortical, mesolímbico y tuberoinfundibular que se originan del área A9 (nigroestriatal), A10 (mesolímbico y mesocortical) y A8 (tuberoinfundibular) respectivamente (Anden *et al.*, 1964). Estas neuronas son críticas en diversas funciones del sistema nervioso central, incluyendo el movimiento voluntario, la alimentación, el afecto, la recompensa, la memoria de trabajo y el aprendizaje entre otros. Varios desordenes en el SNC han sido relacionados con la disfunción y desregulación dopaminérgica. La más común es la enfermedad de Parkinson (EP), que se origina por la pérdida de inervación dopaminérgica hacia el núcleo estriado; la esquizofrenia por desregulación dopaminérgica mesolímbica y otras enfermedades como el déficit de atención por hiperactividad (TDAH) y el síndrome de Tourette. Otros fenómenos de plasticidad anormal de los mecanismos de recompensa que ha sido asociado por el abuso de drogas y la adicción sugiere fuertemente que la Dopamina juega un papel importante en estas condiciones patológicas (Beaulieu y Gainetdinov, 2011).

Síntesis y liberación de Dopamina

El aminoácido tirosina generalmente es considerado como el punto de partida en la biosíntesis de Dopamina y éste es abundante en las proteínas de la dieta. Además, la fenilalanina puede ser convertida en tirosina por la fenilalanina hidroxilasa (hPAH) en el hígado y también en la neuronas dopaminérgicas por la tirosina hidroxilasa (TH).

Una vez ingerida, la tirosina es transportada desde líquido extracelular hacia el interior de las neuronas dopaminérgicas por los transportadores de alta y baja afinidad de aminoácidos para ser convertido en dihidroxifenilalanina (L-DOPA) por hidroxilación en la posición 3 del núcleo catecol, impulsado por la enzima TH citosólica conocida, también, como la enzima limitante en la biosíntesis de Dopamina. Posteriormente, la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC) procede a la conversión L-DOPA a Dopamina (Fig. 1) (Elsworth y Roth; 1997) para que, finalmente, este neuromodulador sea transportado desde el citoplasma a las vesículas sinápticas por el transportador vesicular de monoaminas (vMAT) sensible a reserpina. Aquí la concentración de Dopamina es de aproximadamente 0,1 M (de 10- a 1000 veces más alto que el nivel en el citosol).

La llegada de un potencial de acción a la terminal sináptica conducirá a un cambio en el potencial de membrana celular que es responsable de la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje permitiendo así la afluencia de iones de calcio que es clave en la fusión de las vesículas con la membrana neuronal. Mediante el proceso de exocitosis, las vesículas descargan su contenido soluble en la sinápsis (Beaulieu y Gainetdinov, 2011; Daubner *et al.*, 2010).

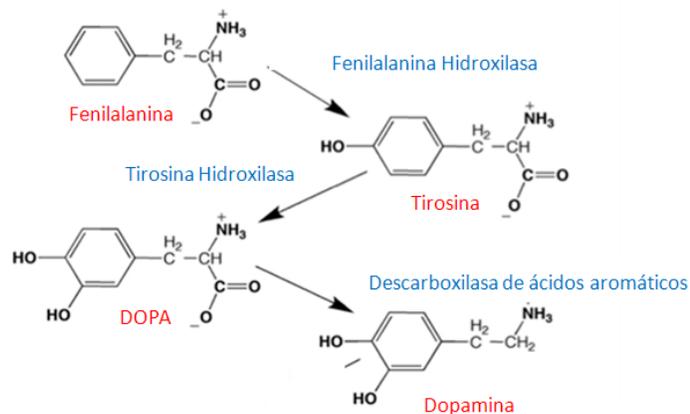


Figura 1: Síntesis de Dopamina a partir de la DOPA con ayuda de la enzima Dopamina- β -hidroxilasa.

Receptores a dopamina y señalización

Una vez liberado de las terminales, la Dopamina se difunde al espacio sináptico y activa a miembros de una gran familia de receptores dopaminérgicos de siete dominios transmembranales que son capaces de activar a las proteínas G heterotriméricas (GPCR's) para inducir mecanismos de señalización intracelular (Fig 2).

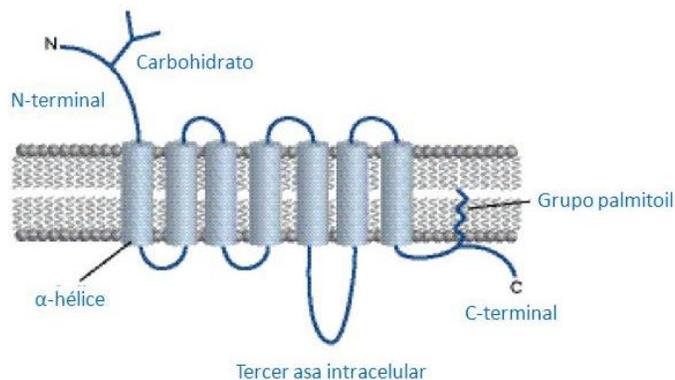


Figure 2: Representación esquemática de un receptor dopaminérgico acoplado a proteína G. El diagrama muestra la disposición de los siete dominios transmembranales alfa-hélices y sus bucles asociados.

En sus dominios transmembranales los receptores D1 y D5 son 79% idénticos entre sí, pero son sólo 40-45% idénticos con respecto a los receptores D2, D3 y D4, la primera indicación de que los cinco receptores pueden ser divididos en subfamilias.

La subfamilia de receptores D1 (D1 like) están conformados por D1 y D5 y son acoplados a proteínas $G_{\alpha s/olf}$ que estimulan a la proteína efectora adenilato ciclasa (AC) provocando así la producción de AMPc y una mayor actividad de PKA, con ello la fosforilación de varios blancos intracelulares tales como la fosfoproteína de función dual regulada por dopamina (DARPP- 32) un potente inhibidor de la proteína

fosfatasa (PP1); mientras que la subfamilia de receptores D2 conformados por los receptores D2, D3 y D4 están acoplados a proteínas $G_{\alpha i/o}$ e inhiben la producción de AMPc disminuyendo la actividad de PKA como se muestra en la Figura 3 (Nave *et al.*, 1999).

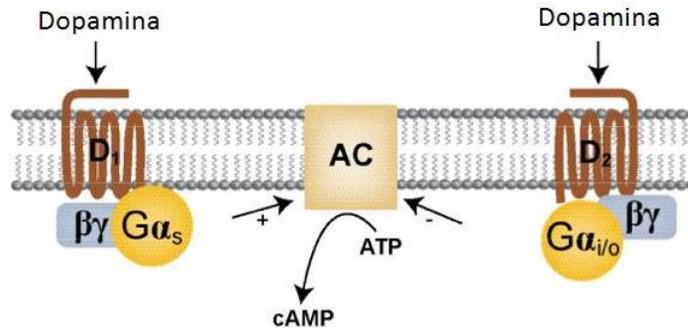


Figure 3: Regulación de la Adenilil ciclasa por los receptores D1 y D2. El diagrama muestra los efectos de la dopamina para inhibir o estimular la adenilil ciclasa (AC) vía receptor D1 y proteína $G_{\alpha s}$ o receptor D2 y proteína $G_{\alpha i/o}$ respectivamente.

Expresión de Receptores Dopaminérgicos

En el cerebro, los receptores D1 son el receptor dopaminérgico que más se expresa. El ARNm se encuentra en gran densidad en las áreas nigroestriatal, mesolímbico y mesocorticales, como el caudado-putamen (cuerpo estriado), núcleo accumbens (NAcc), sustancia negra (SN), bulbo olfativo. Los niveles más altos de receptores de Dopamina D2, son encontrados en el cuerpo estriado, el NAc, tubérculo olfatorio. Los receptores D2 también están expresados en niveles significativos en la SN, el área ventral tegmental, hipotálamo, las áreas corticales, amígdala e hipocampo (Missale *et al.*, 1998).

Se han identificado niveles de segregación de los receptores dopaminérgicos D1 y D2 contenidos en las neuronas espinosas medianas (MNS) en el cuerpo estriado y el

NAc (Valjent *et al.*, 2009). Estos estudios han demostrado de forma convincente que en las MSN se pueden separar claramente en dos principales subgrupos que se definen por sus sitios de proyección y por las proteínas que se expresan. En particular, las MSN que proyectan al globo pálido medial y la sustancia negra pars reticulata (SNr) que incluye un vía estriatonigral expresa selectivamente el receptor de Dopamina D1. Otro grupo de MSN que se proyectan hacia el globo pálido lateral y selectivamente expresan los receptores a Dopamina D2 forma la vía striatopallidal indirecta (Bateup *et al.*, 2010).

Muchas de las funciones vitales además dependen de la activación de los receptores de Dopamina del cerebro. Los receptores D1, D2, y, en menor medida, los receptores D3 están críticamente involucradas en los mecanismos de recompensa. Múltiples estudios han demostrado que las aproximaciones farmacológicas y genéticas que alteran la función del receptor de Dopamina resultan de una modulación significativa de las respuestas a las recompensas naturales y adictivas. Por lo tanto, los receptores de Dopamina permanecen de importancia, tema de interés en la investigación de la drogadicción.

Farmacología

D1R

Los subtipos de receptores de dopamina exhiben diferentes propiedades en términos de sus perfiles farmacológicos, lugares y mecanismos de acción. Numerosos estudios se han centrado en anomalías de la biología del receptor dopaminérgico como una de las causas subyacentes de los trastornos mentales y otras enfermedades. Entender el papel de los receptores dopaminérgicos en estas enfermedades ha iniciado con el desarrollo de técnicas de unión ligando receptor y al desarrollo de agonistas farmacológicos como agentes terapéuticos (Seeman y Van Tol, 1994).

Tanto los receptores D1 como los D5 muestran propiedades farmacológicas similares, es decir, tienen alta afinidad por los ligandos de la familia de benzazepinas, tales como el SKF 83566, SKF 38393, SKF77434, SKF82958, SKF83959, SKF82957 y SKF81297 el agonista más selectivo para los receptores D1.

Otro grupo de agonistas son estructuralmente rígidos que incluyen la apomorfina, dihidrexina, dinapsolina, y dinoxilina. Estos compuestos tienen sistemas de anillos fusionados, restringida movilidad conformacional y sin ninguna enlace de rotación. Por último los isocromanos que incluyen el A68930 y A77633. Los antagonistas son SCH 2339 y el Butaclamol (Maggio R y Millan M; 2010, Zhang B et al; 2014).

D2R

En relación a los receptores de la familia del tipo D2, la magnitud en la potencia de sus agonistas y antagonistas no está claro aún debido a su gran similitud entre ellos. Por ejemplo Bromocriptina es un agonistas con dos órdenes de magnitud más para el D2R y D3R que para el D4R, por otra parte 7-OH-DPAT es 10 veces más potente para los D3R que en los D2R. En el caso de los antagonistas Clozapina es aproximadamente un orden de magnitud más potente a los D4R que para los D2R y D3R; Clorpromazina y racloprida son menos potentes para los D4R que para los D2R y D3R (Seeman y Van Tol, 1994).

CAPÍTULO 2: ADENILATO CICLASA

Función

Las ACs de mamífero son una extensa familia de enzimas codificadas por nueve genes independientes (AC1-AC9) y los diferentes subtipos están limitados a expresarse sólo en ciertos tejidos, estas enzimas son responsables de la conversión de Adenosín Trifosfato (ATP) a Adenosín 3,5-monofosfato (AMPc), un segundo mensajero que media diferentes respuestas celulares a través de la activación de proteínas dependientes del AMPc, por ejemplo, responden a proteínas $G_{\alpha s}$ y a Forskolina (FSK), sin embargo, las diferentes isoformas pueden recibir señales de una gran variedad de moléculas, incluyendo otras proteínas G ($G_{\alpha i}$ y $G_{\beta\gamma}$), proteínas cinasas (PKA, PKC y Calmodulina(CaM)) fosfatasas (Calcineurina), Calcio, y Ca^{2+} /CaM regulando las diferentes vías de señalización (Tesmer JJC *et al.*, 1997; Hanoune y Defer, 2001) (Tabla 1). Las ACs pueden ser reguladas por moléculas pequeñas como la FSK que es un compuesto diterpeno aislado de plantas que puede estimular a las ACs transmembranales y que ha servido para explicar de manera específica el mecanismo por el cual se une su ligando endógeno (ATP) a su sitio catalítico, se ha sugerido que FSK activa a las ACs por la inducción de la dimerización de los C-Terminales de la proteína (Kamenetsky *et al.*, 2006).

Isoformas AC	$G_{\alpha s}$	$G_{\alpha i}$	$G_{\beta\gamma}$	FSK	Calcio	Proteínas Cinasas
AC1	↑	↓ CaM o FSK	↓	↑	↑ (CaM) ↓ (CaM kinase IV)	↑ PKC débil ↓ (CaM cinasa IV)
AC2	↑	→	↑ Cuando es estimulada por $G_{\alpha s}$	↑		↑ (PKC)
AC3	↑	↓		↑	↑ (CaM (in vitro) ↓ (CaM cinasa II)	↑ (PKC) débil ↓ (CaM cinasa II)
AC4	↑		↑	↑		↑(PKC)
AC5	↑	↓	↓ ($\beta 1\gamma 2$)	↑	↓ (<1 μ M)	↓ (PKA) ↑ (PKC α/ζ)
AC6	↑	↓	↓ ($\beta 1\gamma 2$)	↑	↓ (<1 μ M)	↓ (PKA, PKC)
AC7	↑		↑	↑		↑ (PKC)
AC8	↑	↓ (Ca^{2+})		↑	↑ (CaM)	→ (PKC)
AC9	↑	↓		↑ débil	↓ Calcineurina	
sAC	→	→		→		

Tabla 1: Propiedades Regulatorias de las ACs de mamíferos.

El mecanismo por el cual la AC lleva la conversión de ATP a AMPc es a través de la desprotonación del ATP por un ataque nucleofílico del 3'-hidroxil de ATP y la estabilización de un α -fosfato en el estado de transición (Abierto-Cerrado), incrementando la carga negativa del grupo pirofosfato residual. Los fosfatos del ATP se reconocen a sí mismos en el bucle de unión a fosfato de tal manera que permita que los aminoácidos como Asn-1007, Arg-1011, Lys-1047 y Asp 354 participen en el proceso de catálisis. A través de estudios cinéticos se ha demostrado que el AMPc es liberado más rápidamente que el segundo grupo formado, el pirofosfato, por lo cual la enzima adopta su conformación "abierta" después de liberar al segundo mensajero para permitir la unión de otra molécula de ATP y continuar el proceso (Dessauer *et al.*, 1999; Kuznetsova, 2002).

La actividad de AC es alterada por numerosos agentes de interés fisiológico y/o bioquímico, estos incluyen agentes que actúan de manera indirecta, por efecto en receptores a hormonas, en $G_{\alpha s}$ (toxina del cólera (CTX)), en $G_{\alpha i}$ (toxina pertussis (PTX)) o de manera directa a la enzima. Todas las ACs son inhibidas por oxidantes y protegidas por tioles. Los inhibidores de AC permeables a las células que más se han caracterizado son los nucleósidos, efectivos en un rango de μM y los pre-nucleótidos, que funcionan como prodrogas, con una IC_{50} en rangos de nM (Ahuja *et al.*, 2004).

Estructura

Las isoformas de la AC son proteínas de aproximadamente 120-140 kDa que poseen una estructura secundaria muy común: comprenden de un N-terminal intracelular y dos grupos de seis dominios transmembranales (M1 y M2) cada uno separados por una asa citoplasmática, denominado dominio C1 y dominio C2 que contienen una región de 200 aminoácidos aproximadamente con una homología del 40%, la AC heterodimérica consiste de dos subunidades (α y β); la subunidad α que incluye M1/C1 mientras que la subunidad β que incluye a las regiones M2 y C2 (Tesmer, 1997; Kuznetsova, 2002; Sadana, 2009). Se ha determinado a través de cristalografía que las asociaciones de estos dos dominios juegan un papel muy importante para la formación del núcleo catalítico (Cooper, 2005) (Figura 4). El sitio de unión a ATP en

la AC es relevante en la región del sitio P, ya que se ha mostrado que Lys-923 y Asp-1000 de C2 interactúa directamente con N1 y N6 del anillo de ATP adenina, mientras que Gln-417 de C1 participa en la orientación de Lys-923. AC también tiene un sitio de unión a dos iones de Mg^{2+} , un ión actúa como un ión libre cinéticamente, mientras que el otro es unido a ATP, que es similar para las enzimas de la familia de DNA polimerasas (Kuznetsova, 2002).

El diseño, forma y función de AC es claramente visto a través de cristales del complejo $C1_a$ - $C2$ - $G_{\alpha s}$ -FSK. Los dominios $C1_a$ y $C2$ tienen estructuras terciariamente idénticas a pesar de que estas estructuras fueron formadas del C1 de la AC5 y C2 de la AC2 (Tesmer *et al.*, 1999). En relación a la homología los miembros del grupo II y III son más cercanos mientras que el grupo I es el más distantemente relacionado.

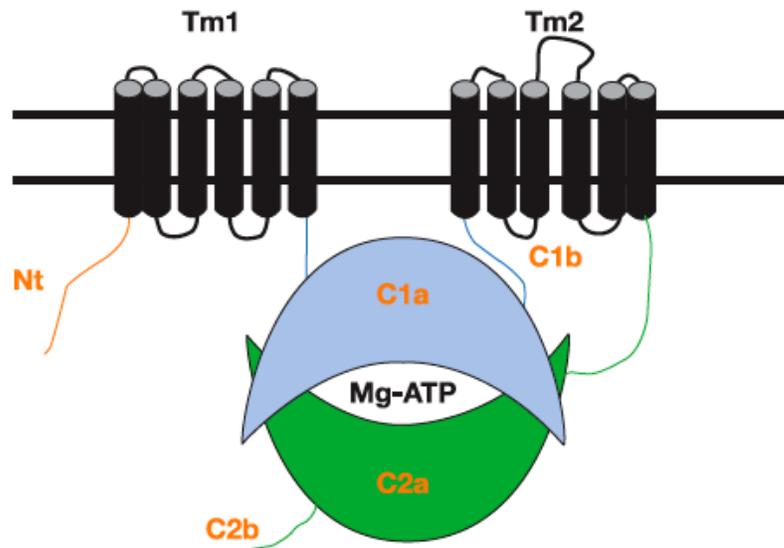


Figura 4: Estructura terciaria de la Adenilato Ciclasa. Las interacciones entre M1 y M2 pueden compensar la débil afinidad de los dominios catalíticos C1 y C2 que son importantes para la formación del sitio de unión a ATP (Cooper, 2003).

Clasificación y Localización

Las ACs transmembranasles son clasificadas dentro de cuatro categorías diferentes de acuerdo a sus propiedades regulatorias. El grupo I se conforma por la isoforma AC1, AC3 y AC8 que son estimuladas por Ca^{2+} localizadas en órganos olfatorios, cerebro, tejido graso, músculo liso y otros tejidos periféricos; el grupo II compuesto por AC2, AC4 y AC7 estimuladas por $G_{\beta\gamma}$ y se encuentran en el músculo esquelético, corazón, riñón, cerebro y pulmón; el grupo III que tienen a las isoformas AC5 y AC6 inhibidas por Ca^{2+} y por G_{ai} , se localizan principalmente el corazón, cerebro, riñón, hígado y pulmón; por último el grupo IV que se conforma por AC9 que es insensible a la FSK presente en el cerebro y músculo esquelético, sin embargo, también se ha caracterizado la isoforma soluble (sAC) en los testículos (Hanoune y Defer, 2001; Sadana, 2009) (Figura 5).

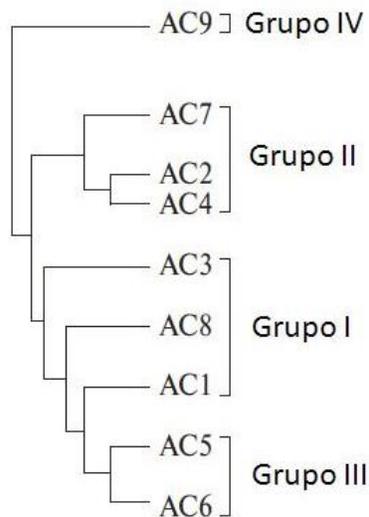


Figura 5: Clasificación de las Adenilato Ciclasas. El grado de homología entre las diferentes isoformas se limita entre un 48-53% (Kuznetsova, 2002).

Debido a la mínima expresión de AC (0.01-0.001% de proteína de membrana) y los anticuerpos pobres disponibles, la mayor parte de la información sobre la distribución

tisular de la enzima se basan en las técnicas de PCR y Northern blot (Sunahara *et al.*, 1996; Sadana, 2009).

Adenilato Ciclasa 5

El cerebro, como se describió anteriormente, expresa nueve isoformas de las 10 que existen (AC1-AC9). La isoforma AC5 fue clonada independientemente por tres grupos, de corazón de perro, hígado y estriado de rata; específicamente es inhibida bifásicamente por Ca^{2+} con una K_i de $<0.4 \mu\text{M}$ para una “alta afinidad” y una K_i de $<100 \mu\text{M}$ para una “baja afinidad”, a concentraciones μM la inhibición de Ca^{2+} no es exclusiva del pirofosfato, un inhibidor no competitivo con respecto al ATP pero a concentraciones $> 100 \mu\text{M}$ la inhibición parece ser exclusiva con respecto al pirofosfato, también se ha observado que este grupo es inhibido. Por otro lado AC5 es estimulado por la proteína cinasa C (PKC) e inhibida por la fosforilación de la proteína cinasa A (PKA), como se mencionó anteriormente, esta isoforma se expresa en la periferia pero principalmente en el cerebro como es el estriado, sin embargo, por hibridación *in situ* en el cerebro de rata se demostró que también se expresa mayoritariamente en el NAc y tubérculo olfatorio y en menor proporción en los Islotes de Callejas, por lo que sorprendentemente su distribución es limitada a regiones inervadas por la DA (Robinson y Caron, 1997; Ying-Zhang Chen, *et al.*, 2012).

CAPÍTULO 3: LA AC5 EN LA FUNCIÓN DOPAMINÉRGICA

Como se mencionó anteriormente la clasificación de los receptores a DA se basa en la actividad que tienen sobre la AC mostrando un papel importante tanto en el estriado como en el NAcc. El estriado es considerado como un centro de integración sensorimotor dentro de los ganglios basales que recibe entradas excitatorias de todas las regiones de la corteza que convergen con señales dopaminérgicas extensivas, tanto de receptores del tipo D1 como del tipo D2, por lo que una actividad concertada y balanceada de estas dos señales dopaminérgicas regula las funciones motoras estriatales (Iwamoto, *et al.*, 2003); por otro lado el NAcc es considerado uno de los núcleos principales involucrados en el efecto del reforzamiento de drogas de abuso y en el desarrollo del síndrome de abstinencia (Avidor-Reiss, *et al.*, 1996), además se ha visto de manera importante que envía proyecciones dopaminérgicas hacia la SNr, núcleo de salida de los Ganglios Basales, que promueve el movimiento por un incremento en la liberación de GABA.

En los últimos años se ha visto la participación de los receptores a DA en el mecanismo de adicción a drogas relacionado con AC, debido a que se expresan de manera mas abundante en la vía mesolímbica que en otras vías dopaminérgicas. A pesar de que el receptor D2 y D3 comparten un alto grado de homología, se mostró que agonistas parciales para D3 como el OS-3-106 y WW-III-55 redujeron la auto-administración de drogas como la cocaína y aunado a esto dichos agonistas también redujeron la actividad motora contribuyendo en parte a la reducción de esta respuesta operante, por lo que se sugiere que el D3 puede jugar un rol esencial en la motivación de la búsqueda de droga mientras que el reforzamiento podría requerir la activación concurrente de tanto de los receptores D2 como los D3 (Cheung *et al.*, 2013).

Con estudios recientes se ha hipotetizado la participación de isoformas específicas de AC, como son la AC1 y AC8 en eventos neuroplásticos y asociados a una regulación de DA en el estriado dorsal y ventral en patologías como la adicción a drogas. Bosse y colaboradores en el 2015 mostraron que la vía AMPc/PKA regula la sensibilización de metanfetamina a través de la estimulación de la AC1 y 8; en ratones Knockout de estas isoformas mostraron una respuesta aguda locomotora comparada con los ratones

silvestres y tuvieron una marcada atenuación en el desarrollo y expresión en la conducta de sensibilización inducida por 5mg/kg de metanfetamina en la vía nigroestriatal; sugiriendo que esta modulación de la sensibilización se deba a la regulación de la liberación de DA y a través de los mecanismos de señalización del calcio inducidos por la activación de la AC.

Cumbay en el 2001 reportó que tanto la activación del receptor D2 largo y corto (D2L-D2S) resultó en un marcado grado de sensibilización de AC1, AC2, AC5 y AC9 pero no de la AC8, caracterizando que la sensibilización es específica de la AC5 fue por un aumento en la acumulación de AMPc después de la estimulación por 100 μ M de FSK; este hallazgo ya había sido mostrado en 1999 por Zimmermann y colaboradores al utilizar una mutante de AC5, el F400Y, aumentando la actividad de la enzima en ausencia de algún fármaco para su activación.

En los últimos años se ha llevado a cabo un gran número de estudios en el estriado sobre la funcionalidad de la AC en la transmisión dopaminérgica, ya que se ha observado que posee un papel central en la activación de los receptores dopaminérgicos, especialmente la AC5, mostrando una relación con la aparición de hiposcinesias (menor movilidad del cuerpo) con una disminución en su actividad y expresión debida a mutaciones por ejemplo, y de una manera contraria a la generación de hipercinesias (mayor movilidad del cuerpo) cuando la enzima está sobreactivada y sobreexpresada.

En el 2003 Iwamoto y colaboradores demostraron que una disrupción genética de AC5 conduce a una pérdida de la actividad de dicha enzima en el estriado (>80%) estimulada con agonistas dopaminérgicos D1 comparado con la corteza cerebral (<27%) y el cerebelo (40%) mostrando solamente el 10% de actividad de AC estimulada por los receptores D1 y el 16% por los receptores a Adenosina A2A, acompañado de un decremento en la expresión de los receptores D1 y $G_{\alpha s}$, mostrando también que la inhibición mediada por agonistas para los receptores D2 fue abolida de manera muy específica en el estriado, provocando un pequeño incremento en la expresión de otras isoformas, sin embargo, ratones knockout de AC5 exhibieron una disfunción motora similar al parkinsonismo, por ejemplo, una coordinación anormal y

bradiscinesias detectadas por el rotarod y evaluadas por medio de cuentas verticales y un menor grado de daño locomotor fue detectado por la prueba de laberinto en T.

La coordinación motora puede ser restaurada por una estimulación de los receptores D2, mientras que las bradiscinesias son restauradas en gran parte ya sea por la actividad residual de AC en el estriado por estimulación de los receptores D1 o D2.

AC5 provee un sitio de convergencia para las señales dopaminérgicas de los receptores D1 y D2 y la inhibición de esta enzima por $G_{\alpha i}$ es una propiedad regulatoria crucial para el control motor dependiente de AMPc (Sadana, 2009).

Años más tarde, en 2012 y 2014, Ying-Zhang Chen y colaboradores observaron por medio de una secuenciación del exoma de AC5 de individuos con discinesia familiar con mioquimia facial (FDFM), un desorden dominante autosomal que es exacerbado por la ansiedad, una mutación en el residuo A726 que es conservado en todas las especies (sustitución de una Treonina polar por una Alanina no polar pequeña), provocando una ganancia de función, sugiriendo que dicha enzima pudiera ser un candidato para desarrollar esta enfermedad hereditaria con síntomas y características fisiológicas muy similares al Parkinsonismo; esta hipótesis fue basada en el fenotipo de un ratón deficiente de AC5 utilizado por Iwamoto.

Por otro lado, Rangel y colaboradores en el 2011 mostraron la relación que existe entre el desarrollo de discinesias y los cambios en la liberación de [3 H]-GABA así como la formación de AMPc en terminales tanto del estriado como de la sustancia nigra reticulada de ratas lesionadas con 6-OHDA y después de un tratamiento crónico con L-DOPA (3,4-dihidroxifenil-L-alanina), los experimentos indicaron que un incremento en la expresión de la AC5 es el mayor determinante del incremento de la producción de [3 H]-AMPc estimulada por FSK y el incremento de la transmisión GABAérgica en la SNr de animales con discinesias severas al estimular a los receptores D1 con su agonista selectivo SKF, ya que a menores concentraciones de NKY (inhibidor selectivo de AC5) se mostró una menor acumulación de AMPc y una menor liberación de GABA, indicando la sensibilización de la enzima.

La isoforma 5 de la AC también está involucrada en el enlace del aprendizaje y la plasticidad sináptica estriatal, en un ratón con la pérdida de función de esta enzima se exhibió una deficiencia en la inducción de LTD (depresión a largo plazo) por

estimulaciones fisiológicas que aparecen como resultado de la pérdida de modulación de los receptores D2 necesarios para la inducción, además la aplicación postsináptica intracelular de AMPc dentro de las neuronas espinosas medianas promovió la inducción de LTD durante la estimulación a altas frecuencias en ratones normales pero no en los ratones knockout de AC5, mostrando una deficiencia de aprendizaje evaluado por el método de Pavlov; sugiriendo que el rol de AC5 en el aprendizaje probablemente involucra todas las regiones estriatales, como el impedimento en la habilidad y la respuesta al aprendizaje involucra al estriado dorsal, mientras que el condicionamiento Pavloviano está involucrado el NAcc, otro núcleo donde AC5 se expresa preferentemente. Además recientemente se ha visto que alteraciones en la plasticidad neuronal del estriado contribuye a los síntomas motores de la enfermedad de Parkinson (Lovinger, 2010; Augustin *et al.*, 2014).

Una exposición repetida a drogas psicoestimulantes genera una actividad condicionada y una conducta relacionada a la ansiedad generando sensibilización, uno de los mecanismos moleculares que se asocian a este fenómeno es la participación de la AC5 mediada por los receptores D1, Kim y colaboradores en el 2008 demostraron que ratones knockout de AC5 disminuyeron de manera considerable la conducta de ansiedad, aún más al administrar el antagonista SCH23309 y aumentó por el agonista a receptores D1, DHX, cuando midieron río abajo los mecanismos moleculares, encontraron que la inducción de c-fos estimulada por DHX disminuyó en el estriado dorso-lateral pero fue incrementada en el estriado dorso-medial y en el NAc, sugiriendo un rol esencial de la AC5 en este núcleo para mantener los niveles normales de ansiedad.

No sólo la AC5 es una isoforma fisiológicamente acoplada a receptores D1 en la respuesta a drogas antipsicóticas sino que se ha visto que AC5 y D2 también participan en esta patología; Lee y colaboradores en el 2002 mostró con ratones Knockout de AC5 que la administración de antagonistas del receptor D2, haloperidol y sulpiride, no produjeron los efectos neurolépticos típicos como sucede con un ratón con la AC5 funcional, sugiriendo que esta isoforma es necesaria para las acciones neurolépticas de estas drogas antipsicóticas y aunque no se conoce mucho sobre este

daño en el sistema D2-G_{ai}-AC, se piensa es producido indirectamente por una reducción de la expresión de G_{ai}.

La participación de AC5 en el abuso de drogas también se ha relacionado a otros tipos de receptores como lo son los μ a opioides, provocando una superactivación de esta enzima; en células COS-7 cotransfectadas con cDNAs de AC5 y receptores μ a opioides se observó que una exposición aguda a opioides inhibió la actividad de la AC, mientras que una exposición prolongada a morfina o encefalina (agonistas de μ) condujeron a una superactivación reversible de la AC dependiente del tiempo, y esta superactivación fue prevenida por PTX (Avidor, et al., 1996); recientes evidencias sugieren que un activador de la señalización de proteínas G (AGS3) está implicado en este fenómeno, Fan y colaboradores en el 2009 observaron que la sobre-regulación de AGS3 es por una superactivación de AMPc debida a la estimulación de la AC5 y AC7 específicamente, tanto en el núcleo accumbens como en el estriado de ratas después de un periodo de abstinencia de morfina; y en el 2011 Xie y colaboradores establecieron que la actividad basal, la sensibilización y la cinética temporal de AC5 se debe específicamente en el complejo RGS9-2/G β 5, un complejo que regula tanto la inhibición como la estimulación de GPCRs implicados directamente en la señalización de AMPc en el estriado.

ANTECEDENTES INMEDIATOS

De manera muy interesante se han observado que los fenómenos conductuales y mecanismos moleculares implicados en el priming de L-DOPA y Anfetamina (AMPH) son muy similares, como la vía de señalización del receptor D1. Un priming es considerado como el incremento de una respuesta a una misma dosis del fármaco en administraciones constantes.

La EP es un desorden neurodegenerativo causado por la degeneración de neuronas dopaminérgicas de la Sustancia Nigra reticulada que proyectan hacia el estriado. L-DOPA es el fármaco de excelencia para tratar este padecimiento, sin embargo, después de una administración prolongada sus efectos terapéuticos disminuyen y genera la aparición de movimientos involuntarios anormales, mejor conocidos como discinesias (Murer, 2011).

Rangel-Barajas en 2011, observó que las ratas lesionadas con 6-OHDA después de un tratamiento de 21 días con L-DOPA, incrementaron su actividad motora en comparación con las que sólo tuvieron la simple lesión dopaminérgica; este aumento de actividad se observó a través de giros contralaterales, incrementándose a lo largo del tratamiento, desenmascarando el efecto del priming de la L-DOPA. Este aumento en la locomoción se vio correlacionado con un incremento en el desarrollo de discinesias a partir del segundo día de tratamiento, acompañado por un incremento en la liberación de [³H]-GABA estimulada por la activación del receptor D1 con su agonista SKF81297, siendo responsable de esta respuesta el incremento en la expresión y actividad de la AC5 en el estriado y en la sustancia nigra reticulada, ya que, al evaluar la liberación del mismo neurotransmisor y la actividad de la enzima por medio de la acumulación de AMPc estimulada por FSK, se observó que ambas respuestas fueron disminuidas mediante el uso del inhibidor selectivo de AC5 (NKY), comparado con las ratas no lesionadas o moderadamente discinéticas, mostrando la sensibilidad de los D1 y de la propia AC5.

Diferentes estudios han mostrado que el incremento de actividad motora y el desarrollo de discinesias también se genera con el priming de AMPH como lo mostró Robertson y Becker en 1987, donde se ve el incremento de la locomoción con un

tratamiento de siete días con 2mg/kg de AMPH y también el aumento considerable de las estereotipias muy similares a las generadas por la L-DOPA; sin embargo, no solamente se ha evaluado la actividad motora sino también aspectos moleculares como es la expresión de factores de transcripción como Δ FosB bajo un tratamiento crónico para estos dos fármacos, mostrando una similitud más en el priming.

Keber y colaboradores en el 2015 exhibieron que bajo un tratamiento crónico con L-DOPA se incrementaba considerablemente el número de células positivas para Δ FosB en el estriado de ratas severamente discinéticas comparadas con las moderadamente discinéticas o las tratadas con solución salina; por otro lado, Rhental y su grupo de trabajo en el 2008 mostró que en ratas tratadas con AMPH se incrementó la expresión del RNAm de c-fos y por consiguiente hubo un incremento también en la expresión de Δ FosB, pero este incremento fue aun más notorio después de cinco días de abstinencia, por lo que se sugiere que hay genes con expresión temprana que rápidamente son inducidos tanto por L-DOPA o por AMPH que tienen como punto final el incremento de DA en el espacio sináptico, L-DOPA por su conversión a DA en las neuronas remanentes o serotoninérgicas y la AMPH por una inversión del transportador a DA (DAT) presináptico evitando la recaptura de este neurotransmisor que posteriormente activará a los receptores a DA postsinápticos como el D1 incrementando su vía de señalización.

Debido a que no existen reportes de la participación de AC5 en la adicción a drogas y al ser la mayor responsable del desarrollo de discinesias, el incremento en la liberación de [3 H]-GABA y en la acumulación de AMPc por modificaciones en su expresión y función bajo un tratamiento crónico con L-DOPA tanto en el estriado y la Sustancia Nigra reticulada, se pretende estudiar a la AC5 ahora bajo un tratamiento crónico con AMPH para poder promoverla como un blanco terapéutico.

HIPÓTESIS

El tratamiento con anfetamina aumenta la expresión y la respuesta funcional de la Adenilato Ciclasa V en el estriado.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la expresión y función de la Adenilato Ciclasa en animales tratados crónicamente con anfetamina en el estriado.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ‡ Estudiar la expresión de la Adenilato Ciclasa V en el Núcleo Accumbens y neostriado de ratas tratadas con Anfetamina por medio de Western Blot.
- ‡ Evaluar la actividad de la Adenilato Ciclasa V estimulada por Forskolina en el Núcleo Accumbens y neostriado de animales normales y tratados con Anfetamina.
- ‡ Estudiar la activación de la Adenilato Ciclasa V modulada por los Receptores D1 sobre la liberación de GABA en animales normales y tratados con Anfetamina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para poder llevar a cabo los objetivos de este trabajo se usaron ratas de la cepa Wistar de 200-230 grs de peso en condiciones de bioterio: 18-23°C, un ciclo de luz-oscuridad de 12 hrs y alimentación *Ad libitum*; se formaron cuatro grupos de cinco ratas cada uno: Control Basal, Control Forskolina, AMPH y AMPH+Reto; a los grupos control se les aplicó solución salina al 0.9% intraperitoneal mientras que los grupos experimentales se les administró 1 mg/kg de AMPH diluida en solución salina. El experimento para evaluar la actividad motora se llevó a cabo a lo largo de 11 días (2 días, Habitación; 5 días Tratamiento; 3 días abstinencia y el último día, reto farmacológico, el cual consiste en administrar una última inyección de AMPH al grupo c/Reto para evaluar la sensibilidad de AC5 (Figura 6)) en cajas especializadas de la marca “Med Associates Inc” durante 60 minutos inmediatamente después de inyectar el tratamiento, tomando en cuenta los parámetros de distancia ambulatoria, velocidad promedio, cuentas verticales y estereotipias, después de evaluar la actividad motora, los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se obtuvieron rebanadas del Núcleo Accumbens Y estriado para la determinación de [³H]-AMPC, liberación de [³H]-GABA y medir la expresión de la enzima por Western blot.

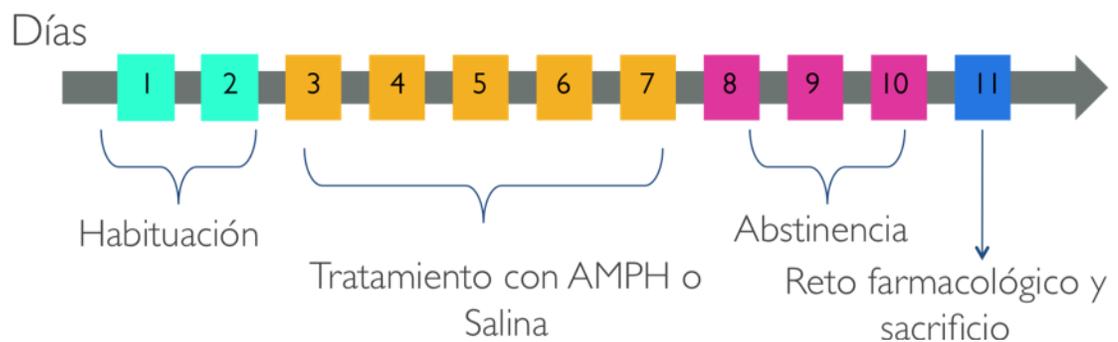


Figura 6: Representación esquemática de los días de tratamiento, abstinencia y reto farmacológico.

Determinación de [³H]-AMPc en rebanadas

Una vez que se obtuvieron las rebanadas de los tejidos de interés se estabilizaron en una solución Krebs-Henseleit (KH) a 37°C con burbujeo constante de O₂/CO₂ (95%/5%) por 30 minutos, después del periodo de estabilización las rebanadas se marcaron con [³H]-Adenina (130nM) en 3ml de solución K-H a la misma temperatura durante 60 minutos, posterior al tiempo de activación se distribuyeron de dos a tres rebanadas por cada tubo, y se incubaron con Forskolina para promover la acumulación de AMPc en presencia de 1mM de IBMX (un inhibidor de fosfodiesterasas) a una temperatura de 37°C. La reacción se detuvo con 100μl de una mezcla fría de AMPc (4.5mM), ATP (2.5mM) y TCA (30%) y se enfrió en hielo por 20 minutos. Para la separación de [³H]-ATP y [³H]-AMPc se utilizaron columnas de intercambio iónico con resina Dowex 50W X-4 para la separación de [³H]-ATP y con Alúmina neutra para la separación de [³H]-AMPc. Las muestras se colocaron primeramente en las columnas Dowex y una vez eluida la mezcla se adicionó individualmente a cada columna 3 ml de agua destilada y se colectó el [³H]-ATP. Posteriormente se colocan las columnas Dowex sobre las de Alúmina y se adicionaron individualmente a cada columna 5 ml de agua destilada, una vez que se eluyó la muestra se retiraron las columnas Dowex y se adicionaron 4ml de la solución Tris-HCl (50mM) y se colectó el [³H]-AMPc. Para la cuantificación del [³H]-ATP y [³H]-AMPc a cada muestra se le adicionaron 10 ml de líquido de centelleo, se obtuvieron cuentas de radioactividad de ambas muestras de cada vial con un contador de centelleo líquido y la formación porcentual de [³H]-AMPc fue calculada de la siguiente manera:

$$\% \text{ [}^3\text{H]-AMPc} = \frac{\text{[}^3\text{H]-AMPc}}{\text{[}^3\text{H]-ATP} + \text{[}^3\text{H]-AMPc}} \times 100$$

Western Blot

Para medir la expresión de AC5, se obtuvieron homogenados de los núcleos de interés y se cuantificó la cantidad de proteína por el método de Bradford. Posterior a esto se utilizaron geles de poliacrilamida al 6%, llevando a cabo la electroforesis a 120V, en seguida de la electroforesis se realizó la transferencia en membranas de nitrocelulosa por 2 horas a 250mA. El bloqueo se hizo con leche Svelty al 7% con PBS-T por dos horas y se incubó con un anticuerpo primario en una dilución 1:1000 toda la noche a 4°C, mientras que el anticuerpo secundario se incubó por 120 minutos a temperatura ambiente en una dilución 1:15000; después de la incubación del anticuerpo secundario se realizaron tres lavados de 7 minutos con PBS-T y se reveló por el método autorradiografía KODAK.

Liberación de [³H]-GABA

Los experimentos de liberación de [³H]-GABA fueron realizados en rebanadas del Núcleo Accumbens de ratas tratadas con salina al 0.9%, con AMPH s/Reto y AMPH c/Reto, estas rebanadas frescas fueron estabilizadas en solución KH a 37°C con burbujeo constante por 20 min. Una vez transcurrido la estabilización se incubaron en una solución fisiológica con [³H]-GABA por 30 min en presencia del ácido aminoxiacético para evitar su degradación, y posteriormente se les adicionó ácido nipecótico [10 mM] para evitar la recaptura. En seguida las rebanadas fueron transferidas a cámaras de perfusión acopladas a un colector de fracciones, donde se trataron con los fármacos a estudiar (FSK, activador de la AC; SKF 38393, agonista selectivo para receptores D1; SCH 23390, antagonista selectivo para los receptores D1). Después de un periodo de estabilización y lavado de 13 min, se colectaron 4 fracciones de 4 min c/u de liberación basal, posteriormente se aplicó un pulso despolarizante cambiando la solución KH normal por una de alto potasio para inducir la liberación de [³H]-GABA por despolarización de la terminal. En cada experimento se corrieron 20 muestras, cinco para cada condición experimental, con mínimo de cinco réplicas de cada grupo estudiado. Al término de cada experimento, las rebanadas fueron extraídas de las cámaras de perfusión y se les adicionó 1ml de HCl

1N, con el fin de desintegrar la membrana y cuantificar la radioactividad permanente en el tejido. Para cuantificar la radioactividad se utilizó la misma técnica para la acumulación de AMPc, es decir, mediante un contador de centelleo, pero los resultados fueron obtenidos como liberación fraccional, la cual se obtuvo de la siguiente relación:

$$F.L. = R.P.F. / R.P.T.$$

Dónde: F.L. es la fracción de liberación, calculada mediante la división de la radioactividad presente por fracción (R.P.F.), sobre la radioactividad remanente en el tejido (R.P.T.). La F.L. se expresó en las gráficas como el cociente de la fracción “X” entre la fracción 4 (fracción inmediata anterior al pulso de K⁺), esto con la finalidad de expresar la fracción de liberación por arriba del valor basal en la curva.

Análisis Estadístico

Para determinar los cambios estadísticos de la actividad motora de las ratas se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con una prueba de Bonferroni. Para comparar estadísticamente los datos obtenidos en la acumulación de AMPc utilizamos una ANOVA de una sola vía seguida de una post-prueba de Tukey. En relación a los datos obtenidos en la liberación de GABA utilizamos una prueba de ANOVA de dos vías para comparar los diferentes grupos experimentales. La significancia estadística de las diferencias fue determinada al nivel del 95% ($p < 0.05$).

RESULTADOS

El priming con AMPH incrementó la actividad motora.

Para evaluar si la administración de AMPH generó cambios en la conducta de los sujetos de estudio, ésta fue evaluada por medio de la actividad locomotora.

En la figura 7 se muestra un incremento progresivo de la actividad motora en ratas tratadas con AMPH comparadas con el grupo al que solo se le administró solución salina, presentando un nivel máximo de actividad en el cuarto día de tratamiento en cada uno de los parámetros evaluados a) Distancia ambulatoria b) Velocidad promedio, c) Cuentas verticales y d) estereotipias, como puede observarse el día del reto farmacológico las ratas ya presentan una posible sensibilización de la AC5.

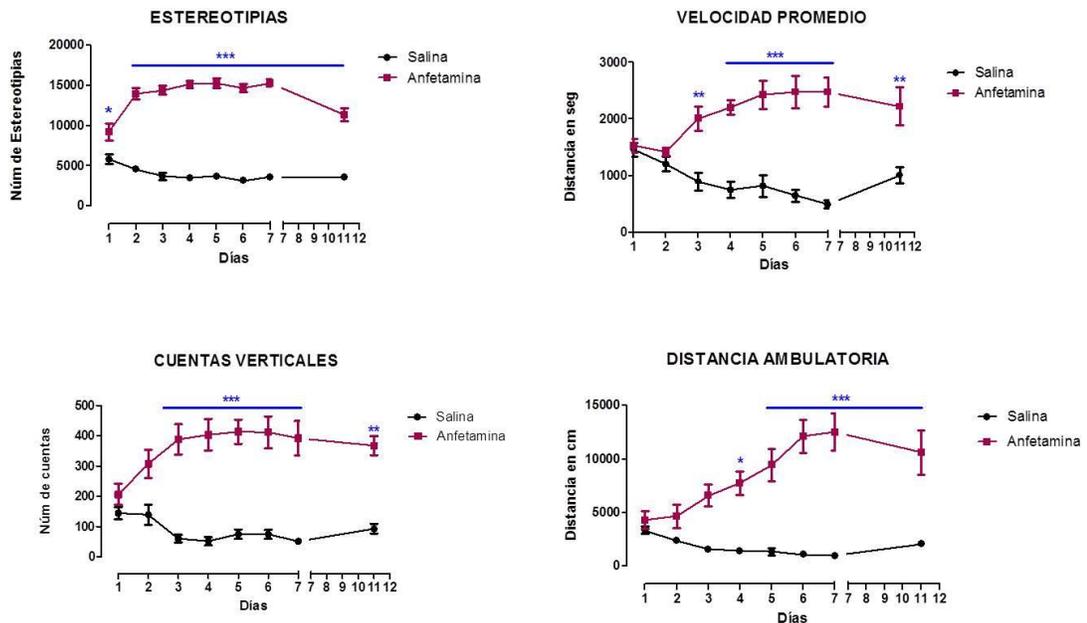


Figura 7: Evaluación de la actividad locomotora bajo el tratamiento con solución salina y AMPH con reto farmacológico en tres principales parámetros a) Distancia ambulatoria b) Velocidad promedio, c) cuentas verticales y d) estereotipias. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$ y *** = $p < 0.001$, la estadística se realizó mediante una ANOVA de dos vías con una post prueba de Bonferroni, $n = 20$.

El tratamiento crónico con AMPH incrementó la Actividad de AC5 en el NAcc.

Para explorar si el incremento de la actividad locomotora en ratas tratadas con AMPH se debe a una sobreactividad de AC5, se midió la acumulación de AMPc en rebanadas de cada grupo experimental. En la figura 8 se observa que en el Núcleo Accumbens de ratas Control-Forskolina hubo un incremento de producción de AMPc comparado con el grupo Control-Basal, sin embargo, la sobreactividad de la AC5 fue muy evidente en ratas del grupo experimental con AMPH pero sobre todo en el grupo de ratas con el reto farmacológico (Challenge).

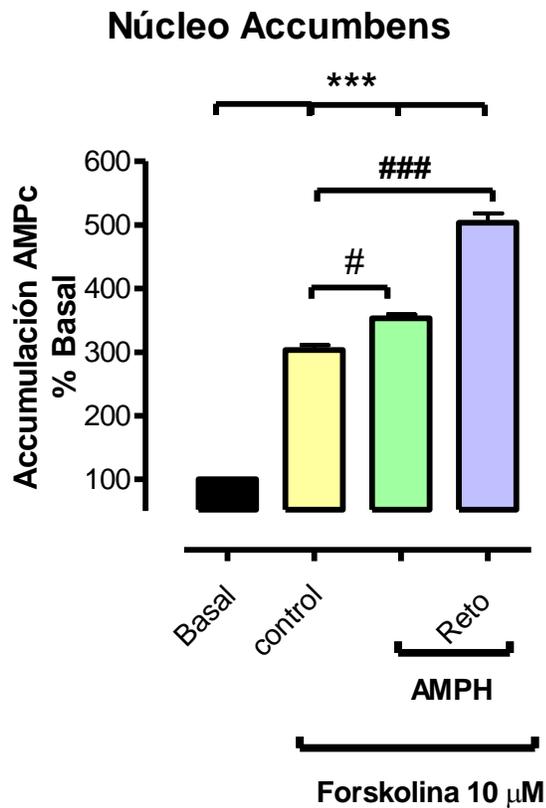


Figura 8: Producción de AMPc en el núcleo accumbens de ratas tratadas con AMPH. La acumulación de AMPc se ve incrementada en ratas tratadas con AMPH comparadas con el basal y con forskolina solamente. Con asteriscos se muestra la diferencia entre los diferentes grupos con una $p < 0.001$ con respecto al control. El # muestra una significancia de $p < 0.05$ y ### una $p < 0.01$.

El tratamiento crónico con AMPH incrementó la Expresión de AC5 en el NAcc y en el Estriado.

Debido a que se observó un incremento en la actividad de la enzima AC5, el siguiente objetivo fue determinar si este efecto estaba siendo mediado por un aumento en la expresión de dicha enzima, por medio de Western Blot. Como se muestra en la figura 9, hubo un incremento de expresión de AC5 en el núcleo accumbens de ratas tratadas con AMPH, con y sin periodo de abstinencia comparadas con el control, sin embargo este incremento en la expresión se vio favorecido en ratas con AMPH y periodo de abstinencia de tres días más el día del reto farmacológico.

El mismo resultado lo obtuvimos en el Estriado (Figura 10), en el cual se observa un incremento en la expresión de AC5 en ratas tratadas con AMPH comparadas con el control, pero sobre todo este incremento fue mayor en ratas que además de ser tratadas con AMPH por cinco días tuvieron tres días de abstinencia y el reto farmacológico; Sugiriendo que la sensibilidad de la AC5 también está presente en el sistema dopaminérgico mesocortical que está implicado en el movimiento del organismo.

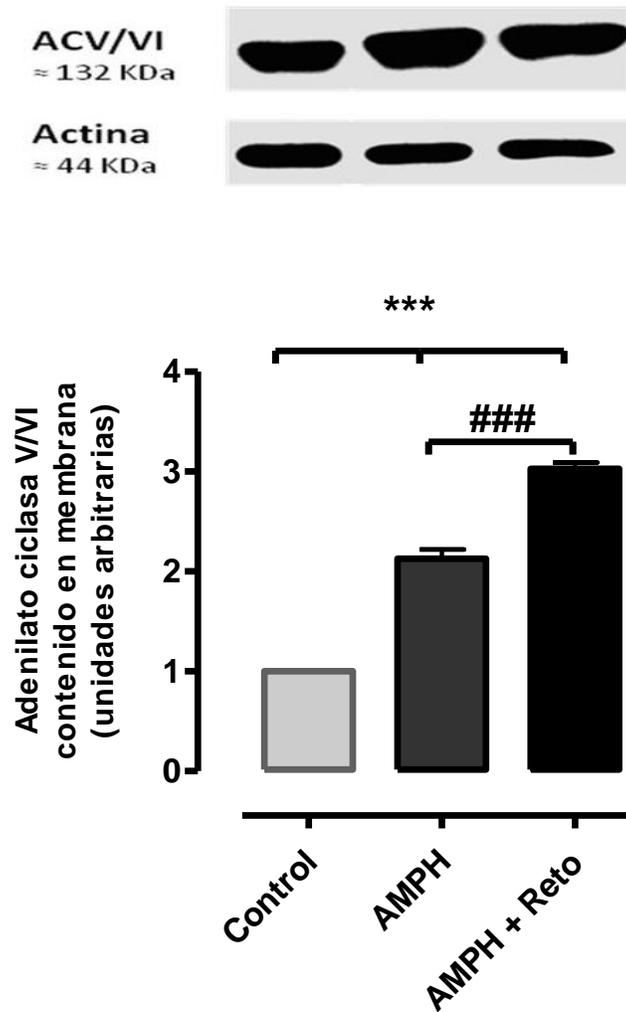


Figura 9: Expresión de AC5 en el Núcleo Accumbens. En la imagen se muestra un incremento de expresión de la enzima en grupos con el tratamiento con AMPH, observando un aumento de la expresión aún más favorecido en ratas tratadas con AMPH y el reto farmacológico (CH) (n=3 experimentos). *** muestran una diferencia significativa con una $p < 0.001$ de los diferentes grupos con respecto al control. ### muestra una diferencia significativa de $p < 0.001$ entre los grupos de AMPH y AMPH+ RETO.

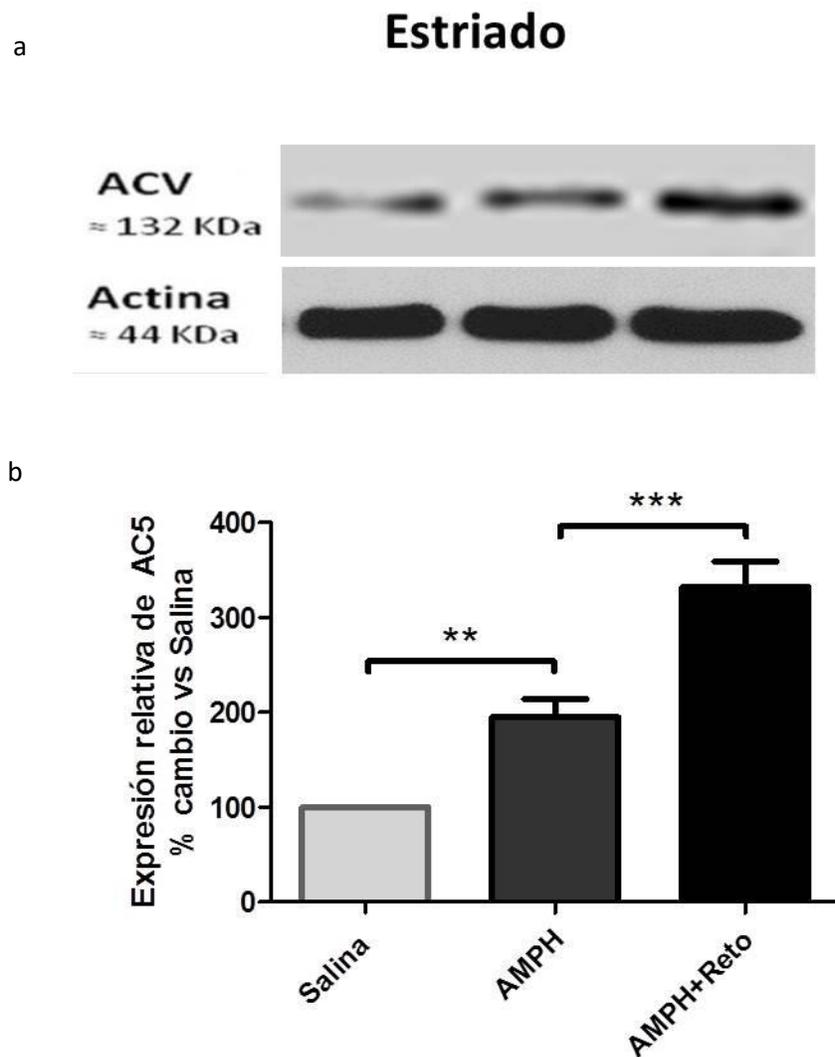
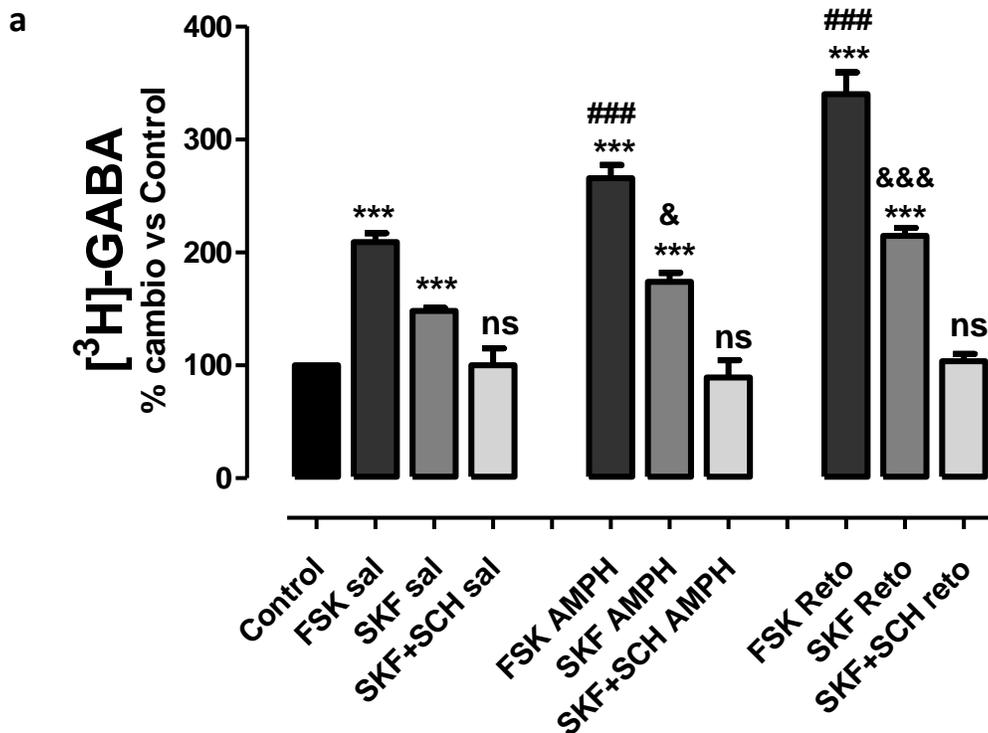


Figura 10: Expresión de AC5 en el Estriado. En **a** se muestra el Western Blot de AC5 y se observa un incremento de expresión de AC5 en ratas tratadas con AMPH pero aún más en ratas con el Reto farmacológico al igual que en **b** que es la densitometría óptica de las bandas. ** = $p < 0.01$ y *** = $p < 0.001$; $n = 3$.

AMPH incrementó la liberación de [³H]-GABA bajo estimulación del Receptor D1 con SKF38393.

Finalmente, para saber si en éste fenómeno tiene alguna participación el D1R, se evaluó la liberación de [³H]-GABA en rebanadas del NAcc y estriado, utilizando un agonista (SKF38393) y un antagonista (SCH23390) selectivo para este receptor. Como se muestra en la figura 11; FSK incrementa la liberación del neurotransmisor en los tres grupos experimentales con relación al control, éste incremento también se ve favorecido por el agonista SKF, observándose una mayor liberación en el grupo del reto farmacológico con respecto al control y al grupo de AMPH, pero este incremento en la liberación de GABA se vio prevenido con el uso de SCH 23390, regresando a los niveles mostrados por el control tanto en el Núcleo Accumbens como en el Estriado. Estos resultados nos sugieren que en el grupo AMPH, pero sobre todo el AMPH + reto farmacológico, incrementan la activación de la AC5 por estimulación de los D1R en el estriado dorsal y ventral.

Núcleo Accumbens



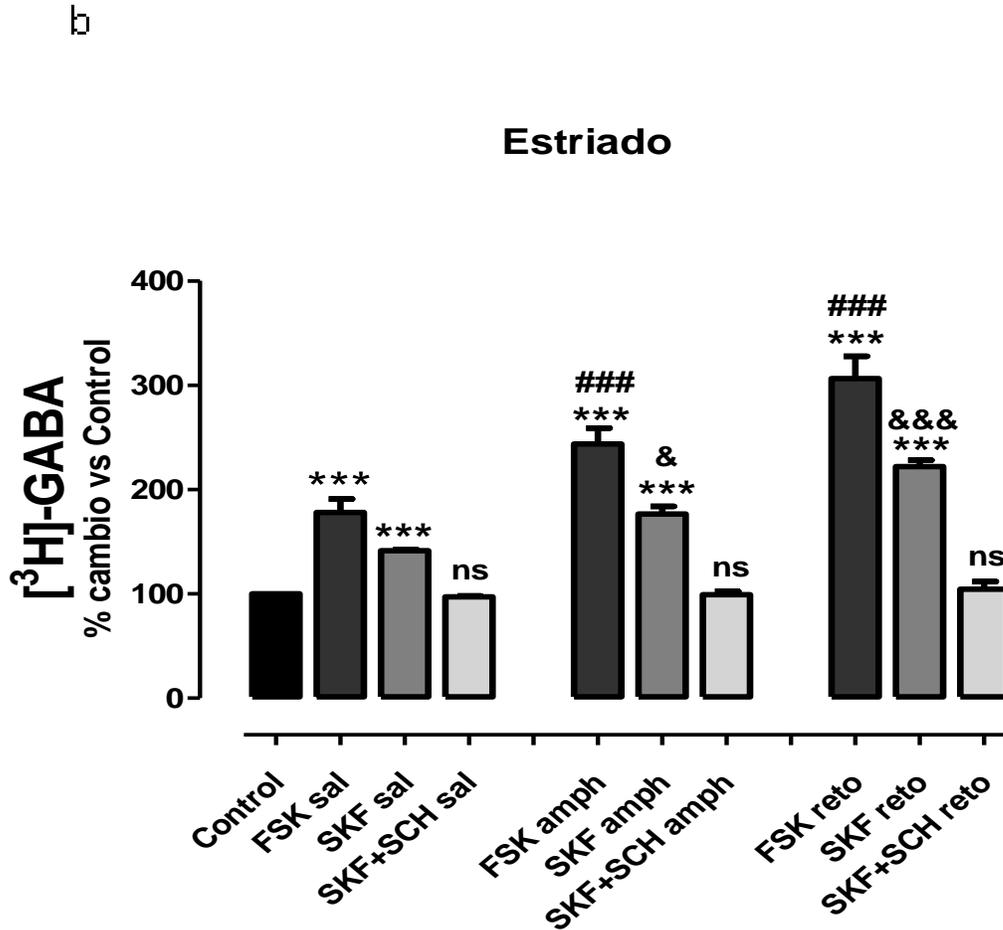


Figura 11: Liberación de $[^3\text{H}]\text{-GABA}$. En esta gráfica se muestra el incremento de la liberación de GABA en los diferentes grupos experimentales utilizando SKF38393 y SCH23390 agonista y antagonista selectivo del D1R respectivamente en el Núcleo Accumbens (a) y en el Estriado (b) ($n=3$ experimentos, 5 replicas en cada condición). ***, ### y &&&= $p<0.001$; &= $p<0.05$; ns= no significativo

Los resultados de este trabajo nos sugieren que el incremento de actividad locomotora en ratas con el tratamiento de AMPH se debe a una superactivación de la Adenilato ciclasa 5 en el núcleo Accumbens y una sobre expresión de la misma enzima, sobre todo en las ratas a las que se les administró una última inyección del psicoestimulante (reto farmacológico) y que puede deberse a una supersensibilidad adquirida después de los cinco días de tratamiento.

DISCUSIÓN

Los avances en neurociencias han identificado a la adicción como una enfermedad crónica con un fuerte componente genético, problemas en neurodesarrollo y en el aspecto sociocultural. La adaptación del Sistema Nervioso a diferentes químicos y condiciones fisiológicas es importante para la homeostasis en los procesos del cerebro así como del aprendizaje y memoria apropiada a respuestas de los diferentes retos enfrentados. Aunque los procesos como la tolerancia y dependencia a varias drogas de abuso se han conocido durante mucho tiempo, se descubrió recientemente que incluso una sola dosis farmacológicamente relevante de varias drogas induce la neuroplasticidad en poblaciones neuronales seleccionadas como las neuronas dopaminérgicas del VTA, cuyos cambios persisten mucho tiempo después de que la droga fue eliminada.

Las drogas de abuso ejercen un efecto de reforzamiento inicial por incrementos suprafisiológicos de dopamina, proveniente de neuronas del VTA y SNc, lo que conlleva a una sobre activación de neuronas encargadas tanto de procesos límbicos (motivacionales en este caso), como procesos motores, respectivamente. La auto administración de drogas induce la expresión de genes, que promueven la actividad condicionada como la búsqueda de la sustancia de abuso generando un incremento en la actividad motora. Una exposición repetida a drogas de abuso provoca cambios plásticos en las entradas glutamatérgicas del estriado y en neuronas dopaminérgicas del cerebro medio, aumentando la actividad del cerebro relacionada con la ansiedad, como fue reportado previamente por Kyoung-Shim y colaboradores en 2008, donde la AC5 presente en NAcc se encuentra participando en procesos ansiolíticos, aunado a esto provocando también la aparición de la sensibilidad en las vías de señalización mesolímbicas. Se ha visto que ésta sensibilización aparece aún más en periodos de abstinencia, específicamente por drogas pro-dopaminérgicas como la Cocaína, Anfetamina y Metanfetamina, que su acción final es el aumento de Dopamina en el

espacio sináptico por el bloqueo o inversión del DAT (Korpi *et al.*, 2015; Volcow y Morales, 2015), activando a los receptores D1 postsinápticos.

La aparición del “priming” con AMPH, indica que la supersensibilidad de los receptores para dopamina se incrementa aún más después del periodo de abstinencia y del reto farmacológico, con respecto al que ya existe con el solo tratamiento y dado que el resultado final de la acción dopaminérgica mediada por los receptores D1 es la liberación de GABA, decidimos estudiar esta respuesta tanto en el Núcleo Accumbens como en el Estriado, observando un incremento en la liberación de este neurotransmisor en los dos núcleos de ratas tratadas con AMPH y bajo el reto farmacológico (figura 10 y 11). Como lo observó Hack y colaboradores en el 2003, el aumento en la señalización de AC produce una hiperexcitabilidad en las terminales GABAérgicas de neuronas del cerebro medio, después de un tratamiento agudo con morfina y más aún después del periodo de abstinencia. Este incremento en la liberación de GABA estimulada por DPCPX fue abolida por el bloqueo de la PKA con RP-8-CPTcAMPS, sugiriendo que la vía de AC/AMPC/PKA esta modificada bajo el tratamiento con morfina, sin embargo, por ser un agonista selectivo para los receptores μ a opioides, no contemplan alguna participación de los receptores para dopamina. Sin embargo, Hu y colaboradores en el 2015, vieron la participación de esta vía de señalización mediante la activación de receptores D1 en ratones tratados con Cocaína, observando que una exposición prolongada a esta droga generó un aumento de actividad de la vía AMPc/PKA/pCREB, sugiriendo que este fenómeno esta mediado predominantemente por la activación de estos receptores.

En los resultados de nuestro trabajo observamos de primera instancia que hubo un incremento en la actividad motora de las ratas (Figura 7), presumiblemente debido al “priming” de AMPH. El desarrollo de la conducta y la sensibilidad por psicoestimulantes con repetidas administraciones se ha estudiado por mucho tiempo. Este conducta de sensibilidad se caracteriza por un aumento en la respuesta motora debido al reto farmacológico con cocaína o anfetamina y se sugiere que alteraciones en el sistema dopaminérgico mesolímbico son las responsables para iniciar y expresar

esta conducta de sensibilidad. Por ejemplo, Tolliver y colaboradores en 1999, demostraron que en ratas tratadas con AMPH intraperitoneal disminuyeron su actividad motora cuando fue bloqueada la actividad de la AC con SQ 22,536, mientras que, la sensibilización conductual generada con micro inyecciones de AMPH en el VTA, fue totalmente abolida con la co-inyección de SQ 22,536, pero sin tener ninguna respuesta en la actividad mediada por administración intraperitoneal de AMPH. Por otro lado, estos autores también mostraron que la activación de AC por 500 ng de CTX incrementó moderadamente la actividad motora de los animales, e indujo una robusta sensibilización con el reto farmacológico de AMPH intraperitoneal después de 10 días de tres microinyecciones en el VTA, sugiriendo que la vía AC-AMPC es necesaria para la inducción de la sensibilización por la administración directa de AMPH en el VTA. Comparando estos resultados con los resultados de nuestro trabajo, podemos proponer que ésta conducta de sensibilización si puede estar dada por esta vía de señalización, incluyendo que la principal responsable es la Adenilato Ciclasa en su isoforma 5, al menos en el Núcleo Accumbens y en el Estriado como centro integrador sensorimotor.

Se ha visto que la dopamina controla la expresión de sus propios receptores de manera diferencial, es decir, estimula la expresión de los receptores D1 pero inhibe la de los receptores D2 manteniendo una actividad balanceada entre ellos y como en los ganglios basales este efecto estimulador de los D1 asegura el efecto final de la dopamina en el control motor del organismo facilitando el movimiento.

Nuestros resultados mostraron que este aumento en la vía de señalización del D1R por AMPH en el Núcleo Accumbens y en el Estriado, también se debe a un incremento en la actividad de la AC5. El efecto de la activación de la AC mediado por FSK sobre la acumulación de AMPc es mayor en las ratas tratadas con AMPH comparadas con las tratadas con solución salina, interesantemente, este efecto fue aún más notorio en aquellas que tuvieron tres días de abstinencia y posteriormente el reto farmacológico. De manera interesante, este efecto fue similar al que observó Rangel-Barajas y colaboradores en el 2011, que, con un tratamiento crónico con L-DOPA

(fármaco que también incrementa la concentración de dopamina en el espacio sináptico), hay un incremento en la producción de AMPc estimulada por FSK en el Estriado y en la Sustancia Nigra reticulata de ratas severamente discinéticas y lesionadas simplemente con 6-OHDA, esto acompañado además de un incremento considerable en la expresión de AC5 para ambos núcleos. Nuestros resultados concuerdan también de alguna manera con lo observado por Cortright y colaboradores en el 2011, donde ellos observan que el tratamiento con AMPH previo a una exposición prolongada a otra droga como es el Δ 9-THC también incrementa la actividad de AC en el Núcleo Accumbens estimulada por FSK, aumentando significativamente las concentraciones de AMPc sugiriendo que el Δ 9-THC sensibiliza la actividad locomotora inducida por AMPH debido a una sobre-regulación de los D1R postsinápticos en el Núcleo Accumbens. Por lo tanto, con estos resultados proponemos que la supersensibilidad de la Adenilato Ciclasa probablemente esté siendo modulada por la dopamina, a través de la activación de los receptores D1.

Debido a que observamos un incremento en la actividad de la AC5 en el Núcleo Accumbens y Estriado, decidimos estudiar la expresión de la AC5 en estos núcleos, el estriado por ejemplo, donde se sabe que tiene su mayor efecto el tratamiento con L-DOPA. Los resultados que obtuvimos mostraron que, en ratas tratadas con AMPH incrementó la expresión de la AC5, efecto que aumentó aún más de manera significativa en el grupo de ratas que además de ser tratadas con AMPH, tuvieron tres días de abstinencia y el reto farmacológico, tanto en el Núcleo Accumbens como en el Estriado, este último, siendo el núcleo que lleva proyecciones GABAérgicas al núcleo de salida de los ganglios basales (la Sustancia Nigra reticulata), teniendo como función la promoción del movimiento. AC aún siendo una enzima que es inhibida por Ca^{2+} , como lo mencionó Bosse y colaboradores en el 2015, ellos sugieren que a pesar de que la AC5 es una de las más abundantes en todo el estriado, las isoformas AC1 y AC8 son las que mayoritariamente se expresan bajo un tratamiento crónico con Metanfetamina ya que son isoformas que no son inhibidas por el Ca^{2+} , al hacer un knockout de AC1 y AC8 observaron que estos ratones tuvieron una respuesta

locomotora menor comparada con los silvestres, además de una marcada atenuación en el desarrollo y expresión de la conducta de sensibilización en la vía nigroestriatal, lo que sugieren que la modulación de la sensibilización se deba a la liberación de dopamina y a través de la señalización de Ca^{2+} inducida por la activación de la AC. De alguna manera nosotros estamos en acuerdo con estos autores, pero a pesar de que la AC5 es inhibida por Ca^{2+} , cabe mencionar que se necesitan concentraciones micro molares y en este caso la concentración de Ca^{2+} disponible no es suficiente para inhibir la actividad de la AC5.

A pesar de que Kim y colaboradores en el 2006, encontraran que AC5 es el principal efector para los receptores a opioides μ y δ , debido a que ratones Knockout de AC5 les permitieron observar una disminución en la actividad motora después de un tratamiento con morfina, nosotros encontramos suficiente evidencia de que la isoforma 5 no sólo actúa bajo receptores a opioides, sino también bajo la activación de receptores para dopamina del tipo D1, como previamente fue demostrado por Rangel-Barajas y colaboradores en 2011.

Con estos resultados sugerimos que la dopamina promueve la actividad de los receptores D1 y por consiguiente de la AC5 en neuronas del Accumbens y del Estriado, manteniendo un balance fisiológico que permite la adecuada liberación de GABA, y que este balance se pierde en patologías como la adicción a drogas, incrementando tanto la actividad motora, como procesos relacionados a la recompensa, provocando que, a pesar de un periodo de abstinencia el paciente pueda recaer en el consumo de drogas. Con el presente trabajo proponemos que la Adenilato Ciclasa en su isoforma 5 pudiera ser un blanco terapéutico para tratar este tipo de patologías, como la adicción a drogas.

CONCLUSIONES

- † El tratamiento con anfetamina incrementa la expresión y funcionalidad de AC5 en el Núcleo Accumbens y en el Estriado.
- † El reto farmacológico incrementa aún más la expresión y funcionalidad de la AC5 en el Núcleo Accumbens y en el estriado.
- † El aumento de expresión y funcionalidad de AC5 en el tratamiento con anfetamina produce super-sensibilización de la respuesta funcional de los receptores dopaminérgicos tipo D1.
- † El priming de anfetamina al igual que el de L-DOPA produce super-sensibilidad de la AC5.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bryan K. Tolliver, Lauren B. Ho, Lisa M. Fox y S. Paul Berger, 1999. Necessary Role for Ventral Tegmental Area Adenylate Cyclase and Protein Kinase A in Induction of Behavioral Sensitization to Intraventricular Tegmental Area Amphetamine. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. JPET 289:38–47. Vol. 289, No. 1.
2. C Missale, SR Nash, SW Robinson, M Jaber, and MG Caron (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78:189–225.
3. Carmen W. Dessauer, John J. G. Tesmer, Stephen R. Sprang and Alfred G. Gilman (1999). The interactions of adenylate cyclases with P-site inhibitors. Elsevier Science. All rights reserved. PII: S0165-6147(99)01310-3. *TiPS* 20 May 1999 (Vol. 20).
4. Claudia Rangel-Barajas, Isaac Silva, Luz María López-Santiago, Jorge Aceves, David Erlij, Benjamín Florán (2011). “L-DOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian rats is associated with up-regulation of adenylyl cyclase type V/VI and increased GABA release in the substantia nigra reticulata”. *Neurobiology of Disease*. 41 (2011) 51–61.
5. Claudia Rangel-Barajas, Isaac Silva, Martha García-Ramírez, Enrique Sánchez-Lemus, Leonor Floran, Jorge Aceves, David Erlij, Benjamín Florán. (2008). “6-OHDA-induced hemiparkinsonism and chronic L-DOPA treatment increase dopamine D1-stimulated [3H]-GABA release and [3H]-cAMP production in substantia nigra pars reticulata of the rat”. *Neuropharmacology*. 55 (2008) 704–711.
6. Cristina Missale, S. Russel Nash, Susan W. Robinson, Mohamed Jaber and Marc G. Caron. (1998). “Dopamine Receptors: From Structure to Function”. *Physiological Reviews*. Vol. 78, Num 1.
7. D.M.F. Cooper. (2005). “Compartmentalization of adenylate cyclase and cAMP signaling”. *Biochemical Society Transactions* (2005) Volume 33, part 6.
8. David M. Lovinger (2010). Neurotransmitter roles in synaptic modulation, plasticity and learning in the dorsal striatum. *Neuropharmacology* 58 (2010) 951e961.

9. Dermot M. F. Cooper (2003). Regulation and organization of adenylyl cyclases and AMPc. *Biochem. J.* 375, 517–529.
10. E Valjent, J Bertran-Gonzalez, D Hervé, G Fisone, and JA Girault (2009). Looking BAC at striatal signaling: cell-specific analysis in new transgenic mice. *Trends Neurosci* 32:538–547.
11. Esa R. Korpi, Biornar den Hollander, Usman Farooq, Elena Vashchinkina, Ramamoorthy Rajkumar, David J. Nutt, Petri Hyytia y Gavin S. Dawe (2015). Mechanisms of Action and Persistent Neuroplasticity by Drugs of Abuse. *Pharmacol Rev.* 2015 Oct;67(4):872-1004. doi: 10.1124/pr.115.010967.
12. HS Bateup, E Santini, W Shen, S Birnbaum, E Valjent, DJ Surmeier, G Fisone, EJ Nestler, and P Greengard (2010). Distinct subclasses of medium spiny neurons differentially regulate striatal motor behaviors. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 14845–14850.
13. Hu Z1, Oh EH2, Chung YB2, Hong JT2, Oh KW, 2015. Predominant D1 Receptors Involvement in the Over-expression of CART Peptides after Repeated Cocaine Administration. *Korean J Physiol Pharmacol.* doi: 10.4196/kjpp.2015.19.2.89.
14. J Elsworth and R Roth (1997). “Dopamine Synthesis, Uptake, Metabolism, and Receptors: Relevance to Gene Therapy of Parkinson’s Disease” *Experimental Neurology.* 144, 4–9 (1997).
15. Jacques Hanoune and Nicole Defer (2001). Regulation and Role of Adenylyl Cyclase isoforms. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41:145–74.
16. James J. Cortright, Daniel S. Lorrain, Jeff A. Beeler, Wei-Jen Tang, and Paul Vezina (2011). Previous Exposure to Δ 9-Tetrahydrocannabinol Enhances Locomotor Responding to but Not Self-Administration of Amphetamine. *JPET* 337:724–733. Vol. 337, No. 3.

17. Jean-Martin Beaulieu and Raul R. Gainetdinov (2011). “The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors”. *Pharmacol Rev* 63:182–217, 2011.
18. John D. Elsworth y Robert H. Roth (1997). Dopamine Synthesis, Uptake, Metabolism, and Receptors: Relevance to Gene Therapy of Parkinson’s Disease. *Experimental Neurology* 144, 4–9 (1997).
19. John J.G. Tesmer, Roger K. Sunahara, Alfred G. Gilman, Stephen R. Sprang (1997). Crystal Structure of the Catalytic Domains of Adenylyl Cyclase in a Complex with Gs α -GTP γ s. *Science*. Vol. 278.
20. KA Neve, JK Seamans, and H. Trantham-Davidson (2004). Dopamine receptor signaling. *J Recept Signal Transduct Res* 24:165–205.
21. KA Neve, RA Henningsten, JR Bunzow, O Civelli (1999). Functional characterization of a rat dopamine D2 receptor cDNA expressed in mammalian cell lines. *Mol Pharmacol* 36(3):446–451.
22. Ko-Woon Lee, Jang-Hee Hong, In Young Choi, Yongzhe Che, Ja-Kyeong Lee, Sung-Don Yang, Chang-Woo Song, Ho Sung Kang, Jae-Heun Lee, Jai Sung Noh, Hee-Sup Shin, and Pyung-Lim Han (2002). Impaired D2 Dopamine Receptor Function in Mice Lacking Type 5 Adenylyl Cyclase. *The Journal of Neuroscience*, September 15, 2002, 22(18):7931–7940
1. Kyoung-Shim Kim, Ko-Woon Lee, In-Sun Baek, Chae-Moon Lim, Vaishnav Krishnan, Ja-Kyeong Lee, Eric J. Nestler, and Pyung-Lim Han (2008). Adenylyl cyclase-5 activity in the nucleus accumbens regulates anxiety-related behavior. *J Neurochem*. 2008 October ; 107(1): 105–115. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05592.x.
2. Kyoung-Shim Kim, Ko-Woon Lee, Kang-Woo Lee, Joo-Young Im, Ji Yeoun Yoo, Seung-Woo Kim, Ja-Kyeong Lee, Eric J. Nestler, and Pyung-Lim Han (2006). Adenylyl cyclase type 5 (AC5) is an essential mediator of morphine action. *PNAS*. 3908–3913 *PNAS*. vol. 103, no. 10.

3. L. A. Kuznetsova (2002). Regulatory Properties of Adenylyl Cyclase Isoforms. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, Vol. 38, No. 4, 2002, pp. 371—391.
4. Maggio R, Millan MJ (2010). "Dopamine D2-D3 receptor heteromers: pharmacological properties and therapeutic significance". *Current Opinion in Pharmacology* 10 (1): 100–7.
5. Margarita Kamenetsky, Sabine Middelhaufe, Erin M. Bank Lonny R. Levin, Jochen Buck and Clemens Steegborn (2006). Molecular Details of cAMP Generation in Mammalian Cells: A Tale of Two Systems. *J. Mol. Biol.* 362, 623–639.
6. Mario Gustavo Murer y Rosario Moratalla (2011). Striatal signaling in L-DOPA-induced dyskinesia: common mechanisms with drug abuse and long term memory involving D1 dopamine receptor stimulation. *Frontiers in Neuroanatomy*. doi: 10.3389/fnana.2011.00051.
7. Mohamed Jaber, Susan W. Robinson, Cristina Missale and Marc G. Caron. (1996). "Dopamine receptors and brain function". *Neuropharmacology*. Vol. 35, Num 11, pp. 1503-1519.
8. NE Anden, A Carlsson, A Dahlstroem, K Fuxe, NA Hillarp, and K Larsson (1964). Demonstration and mapping out of nigro-neostriatal dopamine neurons. *Life Sci* 3:523–530.
9. Nidhi Ahuja, Praveen Kumar & Rakesh Bhatnagar (2004). The Adenylate Cyclase Toxins. *Critical Reviews in Microbiology*, 30:3, 187-196.

10. Nora D. Volkow y Marisela Morales, 2015. The Brain on Drugs: From Reward to Addiction. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.046>. Cell 162, August 13, 2015
©2015 Elsevier Inc.
11. Omar S. Mabrouk, Daniel Z. Semaan, Sarah Mikelman, Margaret E. Gnegy and Robert T. Kennedy. (2014). “ Amphetamine stimulates movement through thalamocortical glutamate release”. Journal of Neurochemistry. 10.1111/jnc.12378.
12. Oscar Arias-Carrión, Maria Stamelou, Eric Murillo-Rodríguez, Manuel Menéndez-González, Ernst Pöppel. (2010). “Dopaminergic reward system: a short integrative review”. International Archives of Medicine, 3:24.
13. Peidong Fan, Zhan Jiang, Ivan Diamond, and Lina Yao (2009). Up-Regulation of AGS3 during Morphine Withdrawal Promotes cAMP Superactivation via Adenylyl Cyclase 5 and 7 in Rat Nucleus Accumbens/Striatal Neurons. Molecular Pharmacology 76:526–533.
14. Rachna Sadana, Nathan Dascal, and Carmen W. Dessauer (2009). N Terminus of Type 5 Adenylyl Cyclase Scaffolds Gs Heterotrimer. Mol Pharmacol 76:1256–1264.
15. Roger K. Sunahara, Carmen W. Dessauer, and Alfred G. Gilman (1996). Complexity and Diversity of Mammalian Adenylyl Cyclases. AMU Rev. Phannacol. Toxicol. 19%. 36461-80.
16. S Daubner;, T. S. Le Wang (2010). “Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis”. *Arch Biochem Biophys*. 1;508(1):1-12.
17. Seeman P, Van Tol HH (1994) Dopamine receptor pharmacology. Trends Pharmacol Sci 15:264–270. CrossRefMedlineGoogle Scholar.
18. Shana M. Augustin,¹ Jeff A. Beeler,² Daniel S. McGehee,^{1,3} and Xiaoxi Zhuang (2014). Cyclic AMP and Afferent Activity Govern Bidirectional Synaptic Plasticity in

- Striatopallidal Neurons. *The Journal of Neuroscience*, May 7, 2014 • 34(19):6692–6699.
19. Shankar J. Chinta, Julie K. Andersen. (2005). “Dopaminergic neurons”. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37 (2005) 942–946.
 20. Stephen P. Hack, Christopher W. Vaughan, MacDonald J. Christie, 2003. Modulation of GABA release during morphine withdrawal in midbrain neurons in vitro. *Neuropharmacology* 45 (2003) 575–584.
 21. Tamio Iwamoto, Satoshi Okumura, Kousaku Iwatsubo, Jun-Ichi Kawabe, Koji Ohtsu, Ikuko Sakai, Yoko Hashimoto, Aki Izumitani, Kazunori Sango_, Kyoko Ajiki_, Yoshiyuki Toya, Satoshi Umemura, Yoshio Goshima, Nobutaka Arai_, Stephen F. Vatner, and Yoshihiro Ishikawa. (2003). “Motor Dysfunction in Type 5 Adenylyl Cyclase-null Mice”. *The Journal Biological Chemistry*. Vol. 278, No. 19, Issue of May 9, pp. 16936–16940.
 22. Timothy H. C. Cheung, Amy L. Loriaux, Suzanne M. Weber, Kayla N. Chandler, Jeffrey D. Lenz, Romina F. Schaan, Robert H. Mach, Robert R. Luedtke, and Janet L. Neisewander (2013). Reduction of Cocaine Self-Administration and D3 Receptor-Mediated Behavior by Two Novel Dopamine D3 Receptor-Selective Partial Agonists, OS-3-106 and WW-III-55s. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1521-0103/347/2/410–423.
 23. Tomer Avidor-Reiss, Igal Nevo, Rivka Levy, Thomas Pfeuffer, and Zvi Vogel. (1996). “Chronic Opioid Treatment Induces Adenylyl Cyclase V Superactivation INVOLVEMENT OF G β γ ” . *The Journal Biological Chemistry*. Vol. 271, No. 35, Issue of August 30, pp. 21309–21315.
 24. Ying-Zhang Chen, MD, PhD; Mark M. Matsushita, BS; Peggy Robertson, PhD; Mark Rieder, PhD; Santhosh Girirajan, MBBS, PhD; Francesca Antonacci, PhD; Hillary Lipe, MN, ARNP; Evan E. Eichler, PhD; Deborah A. Nickerson, PhD; Thomas D.

- Bird, MD; Wendy H. Raskind, MD, PhD. (2012). “Autosomal Dominant Familial Dyskinesia and Facial Myokymia Single Exome Sequencing Identifies a Mutation in Adenylyl Cyclase 5”. *Arch Neurol*. 2012;69(5):630-635.
25. Ying-Zhang Chen, MD, PhD; Mark M. Matsushita, BS; Peggy Robertson, PhD; Mark Rieder, PhD; Santhosh Girirajan, MBBS, PhD; Francesca Antonacci, PhD; Hillary Lipe, MN, ARNP; Evan E. Eichler, PhD; Deborah A. Nickerson, PhD; Thomas D. Bird, MD; Wendy H. Raskind, MD, PhD (2012). Autosomal Dominant Familial Dyskinesia and Facial Myokymia. Single Exome Sequencing Identifies a Mutation in Adenylyl Cyclase 5. *Arch Neurol/Vol 69 (No. 5)*.
26. Zhang B, Albaker A, Plouffe B, Lefebvre C, Tiberi M.(2014). “Constitutive activities and inverse agonism in dopamine receptors”. *Adv Pharmacol*. 70:175-214.