



CENTRO DE INVESTIGACIONES Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

***“Posible uso terapéutico de los antagonistas de los receptores GABA-B en el control de las discinesias inducidas por L-dopa en el Parkinson experimental”***

TESIS

Que presenta:

QFB. KAREN KENIA JIMÉNEZ MARTÍNEZ

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Director de la Tesis:

Dr. Benjamín Florán Garduño

México, D. F.

Agosto, 2015

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio # 4 del departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Benjamín Florán Garduño y con el proyecto financiado por CONACyT No. 152326.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional por haberme brindado la mejor formación académica y científica.

Al Dr. Benjamín Florán Garduño por su asesoría y apoyo incondicional para la realización de este trabajo, pero sobre todo por su amistad.

A mi Comité tutorial conformado por el Dr. Ismael Jiménez Estrada y el Dr. Jorge Aceves Ruiz por la revisión de esta tesis y su asesoría durante el desarrollo de la misma.

Al CONACyT por la beca y el apoyo otorgado con el fin de cumplir con los objetivos del programa.

A todos los auxiliares y técnicos de los laboratorios #4 y #7 por su asistencia y asesoría técnica.

A mis compañeros de cursos y del laboratorio porque sin duda formaron parte muy importante en mi crecimiento académico y personal. Gracias sinceras a cada uno por haberme brindado su amistad.

A mis padres y hermanas que han estado ahí siempre para apoyarme, comprenderme y ayudarme a alcanzar esta meta.

A mis abuelos y de manera especial a mi tía Ise que seguramente desde el cielo me estuvieron cuidando y apoyando en todo momento.

# ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| <b>RESUMEN</b> .....  | 10 |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | 11 |
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....  | 12 |
| 1.1 <b>ENFERMEDAD DE PARKINSON.</b> ....  | 12 |
| 1.1.1 <b>FISIOPATOLOGÍA</b> .....   | 13 |
| 1.1.2 <b>TERAPIA</b> .....  | 15 |
| 1.1.4 <b>LEVODOPA-CARBIDOPA</b> .....   | 15 |
| 1.2 <b>GANGLIOS BASALES</b> .....   | 16 |
| 1.2.1 <b>CIRCUITO DE LOS GANGLIOS BASALES</b> .....                                   | 17 |
| 1.2 <b>DOPAMINA</b> .....   | 19 |
| 1.2.1 <b>PROYECCIONES DOPAMINÉRGICAS</b> .....  | 20 |
| 1.2.2 <b>RECEPTORES A DOPAMINA</b> .....  | 22 |
| 1.4 <b>L-DOPA Y LAS DISCINESIAS.</b> .....  | 24 |
| 1.5 <b>RECEPTORES GABAÉRGICOS</b> .....   | 25 |
| 1.5.1 <b>RECEPTORES GABA B</b> .....  | 26 |
| <b>2. ANTECEDENTES DIRECTOS</b> .....   | 28 |
| 2.1 <b>RELACIÓN DE LOS RECEPTORES D1 CON LOS RECEPTORES GABA B.</b> .....             | 28 |
| <b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....  | 29 |
| <b>4. HIPÓTESIS</b> .....   | 30 |
| <b>5. OBJETIVO</b> .....  | 31 |
| 5.1 <b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....   | 31 |
| <b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....  | 31 |
| 6.1 <b>ANIMALES</b> .....   | 31 |
| 6.2 <b>LESIÓN CON 6-HIDROXIDOPAMINA</b> .....   | 31 |
| 6.3 <b>CONDUCTA DE GIRO</b> .....   | 32 |
| 6.4 <b>EXPERIMENTOS PARA MEDIR LA LIBERACIÓN DE GABA RADIATIVO</b> ..                 | 32 |
| 6.5 <b>TRATAMIENTO CON L-DOPA Y FÁRMACOS CON ACCIÓN SOBRE RECEPTORES GABA B</b> ..... | 33 |
| 6.6 <b>EVALUACIÓN CONDUCTUAL DE DISCINESIAS</b> .....                                 | 34 |
| 6.7 <b>PRUEBA DEL CILINDRO</b> .....  | 34 |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 6.8        | SOLUCIONES EMPLEADAS .....  | 35        |
| 6.9        | ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....  | 35        |
| <b>7.</b>  | <b>RESULTADOS .....</b>   | <b>35</b> |
| 7.1        | ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE LOS RECEPTORES D1 Y LOS<br>RECEPTORES GABA B SOBRE LA LIBERACIÓN DE [ <sup>3</sup> H]GABA EN RATAS CON<br>DENERVACIÓN DOPAMINÉRGICA ..... | 35        |
| 7.1.1      | TRATAMIENTO CON L-DOPA.....   | 38        |
| 7.1.2      | TRATAMIENTO CON L-DOPA Y EL AGONISTA DE RECEPTORES GABA<br>B, BACLOFEN. ....  | 39        |
| 7.1.3      | TRATAMIENTO CON L-DOPA Y EL ANTAGONISTA DE RECEPTORES<br>GABA B, CGP54626.....  | 40        |
| 7.1.4      | TRATAMIENTO CON L-DOPA Y EL ANTAGONISTA DE RECEPTORES<br>GABA B, SACLOFEN. ....   | 42        |
| 7.1.5      | EFFECTO DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON L-DOPA Y LOS<br>ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR GABA B SOBRE LA INCIDENCIA DE<br>DISCINESIAS .....  | 44        |
| <b>8.</b>  | <b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>   | <b>45</b> |
| <b>9.</b>  | <b>CONCLUSIONES.....</b>  | <b>48</b> |
| <b>10.</b> | <b>PERSPECTIVAS .....</b>   | <b>48</b> |
| <b>11.</b> | <b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>   | <b>49</b> |

## LISTA DE ABREVIATURAS

***μg*** microgramo

***μl*** microlitro

**6-OHDA** 6-Hidroxidopamina

**7TM** 7 dominios transmembranales

**AC** Adenilato Ciclasa

**ADN** ácido desoxirribonucleico

**AMPc** Adenosin monofosfato cíclico

**CDNF** factor neurotrófico de la dopamina cerebral

**COMT** Catecol-O-metiltransferasa

**DCAA** Descarboxilasa de Aminoácidos Aromáticos

**DYSK** Discinético

**EP** Enfermedad de Parkinson

**GABA** Ácido gama-aminobutírico

**GDNF** Factor neurotrófico derivado de la glía

**GIRK** Canal de potasio rectificador de entrada acoplado a proteínas G

**GPCR** Receptor acoplado a Proteínas G

**GPe** Globo Pálido externo

**GPI** Globo Pálido interno

**ip** intraperitoneal

**kg** kilogramo

**KH** Krebs Henseleit

**L-dopa** Levodopa

**MANF** Factor neurotrófico mescencefálico derivado de astrocitos

**MAO-B** Monoamina oxidasa B

**mg** miligramo

**min** minuto

**mm** milímetro

**mM** milimolar

**MPTP** 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

**NaCl** cloruro de sodio

**KCl** cloruro de potasio

**MgSO<sub>4</sub>** sulfato de magnesio

**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** fosfato ácido de potasio

**CaCl<sub>2</sub>** cloruro de calcio

**NaHCO<sub>3</sub>** bicarbonato de sodio

**ND** no discinético

**NST** Núcleo Subtlámico

**PKA** Proteín Cinasa regulada A

**ROS** especies reactivas de oxígeno

**RT-PCR** reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

**SNC** Sistema Nervioso Central

**SNc** Sustancia Nigra compacta

**SNr** Sustancia Nigra reticulata

**SP** Sustancia P

**TH** Tirosina Hidroxilasa

**TO** tubérculo olfatorio

## LISTA DE FIGURAS Y GRAFICAS

**Figura 1.** Cortes horizontales post-mortem del cerebro medio de: un paciente con enfermedad de Parkinson y de una persona sana o control (C), mostrando una pérdida de pigmentación en la Sustancia Nigra en la enfermedad de Parkinson.

**Figura 2.** Estructura molecular de 6-OHDA y MPTP

**Figura 3.** Esquema representativo de la localización anatómica de los núcleos que conforman los Ganglios basales.

**Figura 4.** Ilustración de la organización funcional del circuito de los ganglios basales.

**Figura 5.** Síntesis de dopamina. El aminoácido tirosina es hidroxilado mediante la enzima Tirosina hidroxilasa para convertirse en dopa, la cual es convertida a dopamina mediante la acción de la Descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos.

**Figura 6.** Vías dopaminérgicas en el cerebro de mamíferos.

**Tabla 1.** Los principales segundos mensajeros participantes en las vías de señalización de los receptores dopaminérgicos.

**Tabla 2.** Caracterización de los receptores GABA-B: estructura molecular, vías de señalización, localización y fenotipo de ratones knock-out.

**Figura 7.** Cronograma de experimentos a partir del día de la lesión.

**Figura 8.** Efecto de los agonistas y antagonistas de los receptores GABA-B sobre la liberación de [<sup>3</sup>H]GABA en la sustancia nigra pars reticulata de ratas con denervación dopaminérgica.



**Figura 9.** Efecto de los agonistas y antagonistas de los receptores GABA-B sobre la liberación de [ $^3$ H]GABA y su interacción con los receptores D1 en la sustancia nigra pars reticulata de ratas con denervación dopaminérgica.

**Figura 10.** A. Curso temporal del promedio de las discinesias registradas durante los 21 días de tratamiento con L-dopa (10 mg/kg y 5 mg/kg) en ratas previamente lesionadas con 6-OHDA. B. Prueba de cilindro realizado a todos los animales tratados y previamente lesionadas con 6-OHDA.

**Figura 11.** Curso temporal del promedio de las discinesias registradas durante los 21 días de tratamiento. Del día 1 al 10 se administró únicamente L- dopa (10 mg/kg). A partir del día 11 y hasta el 21, se co-administró L- dopa (10 mg/kg) y baclofen (4 mg/kg) en ratas previamente lesionadas con 6-OHDA.

**Figura 12.** A Curso temporal del promedio de las discinesias registradas durante los 21 días de tratamiento. Del día 1 al 10 se administró L-dopa (10 mg/kg). A partir del día 12 y hasta el 21, se co-administró L-dopa (5 mg/kg) y CGP 54626 (0.1 mg/kg) en ratas previamente lesionadas con 6-OHDA. B. Prueba de cilindro realizado a todos los animales tratados y previamente lesionadas con 6-OHDA

**Figura 13.** A y B. Curso temporal del promedio de las discinesias registradas durante los 21 días de tratamiento. A. Se co-administró saclofen (0.1 mg/kg) y L-dopa (10 mg/kg) en ratas previamente lesionadas con 6-OHDA. B. Se co-administró saclofen (0.1 mg/kg) y L-dopa (5 mg/kg) en ratas previamente lesionadas con 6-OHDA C. Prueba de cilindro de ambos grupos de ratas.

**Figura 14.** Proporción de discinesias expresadas en porcentaje de ratas discinéticas y no discinéticas de los diferentes grupos tratados y previamente lesionados con 6-OHDA.

## RESUMEN

El tratamiento crónico con L-dopa de la enfermedad de Parkinson presenta varias complicaciones de las cuales la más importante son las discinesias. Estas han sido asociadas a un incremento de la actividad de la vía estriado-nigral por supersensibilidad de receptores dopaminérgicos D1, provocando una respuesta exacerbada de la liberación de GABA en la sustancia nigra pars reticulata. Por otro lado se sabe que los receptores GABA-B se encuentran inhibiendo la liberación de GABA en terminales estriado-nigrales antagonizando los receptores D1. Con base a los roles opuestos de los receptores D1 y GABA-B sobre la liberación de GABA, podría recomendarse el uso concomitante de la L-DOPA con fármacos selectivos para receptores GABA-B. En este trabajo estudiamos dos esquemas terapéuticos para probar esta hipótesis.

En ratas hemiparkinsónicas tratadas con L-dopa medimos la frecuencia e intensidad de discinesias así como el efecto terapéutico del fármaco. Encontramos que la administración crónica de L-dopa a dosis terapéuticas (10 mg/Kg) genera una incidencia de discinesia en un 50% de los animales parkinsónicos. La administración concomitante de baclofén el agonista de los receptores GABA-B no modificó la incidencia ni la intensidad de los movimientos discinéticos. Pensando en que el bloqueo de receptores GABA-B aumenta la liberación de GABA y que la dosis de L-dopa administrada es determinante para la aparición de discinesias, hicimos ensayos en los que combinamos una dosis sub-terapéutica de L-dopa (5 mg/Kg) y usamos una antagonista de los receptores GABA-B el CGP 54626 o el saclofén. Encontramos que con esta estrategia la incidencia de discinesias disminuyó significativamente y mantuvieron un efecto terapéutico adecuado.

Estos datos indican que el bloqueo de los receptores GABA-B, con la disminución en la dosis de L-dopa, podría ser útil en el manejo de las discinesias inducidas por L- dopa en la enfermedad de Parkinson.

## ABSTRACT

Chronic treatment with L- dopa for Parkinson's disease has several complications of which the most important are dyskinesias. These have been associated with an increased activity of nigral-striatal pathway by D1 dopamine receptor supersensitivity, causing a heightened response of GABA release in the substantia nigra pars reticulata. Furthermore it is known that GABA-B receptors are inhibiting GABA release on striato-nigral terminals antagonizing D1 receptor. Based on the opposing roles of D1 and GABA-B receptors on the release of GABA, it could be recommended concomitant use of L-dopa with selective drugs for GABA-B receptors. We study two therapeutic schemes to test this hypothesis.

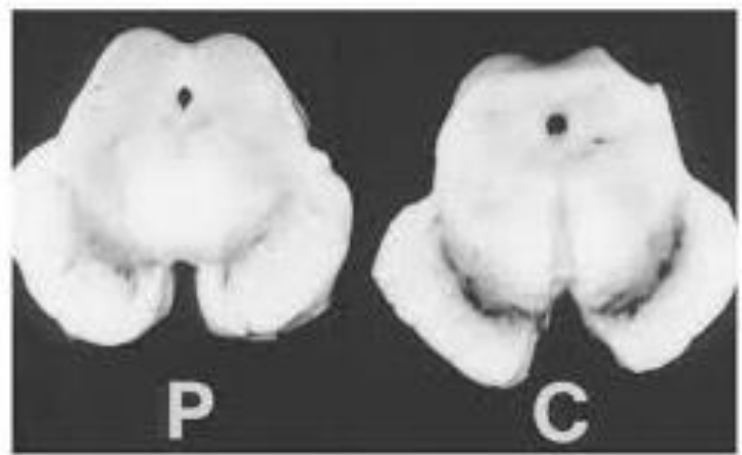
In hemiparkinsonic rats treated with L-dopa we measured the frequency and intensity of dyskinesias as well as the therapeutic effect of the drug. We found that chronic administration of L-dopa at therapeutic doses (10 mg / Kg) generates an incidence of dyskinesia in 50% of parkinsonic animals. Concomitant administration of baclofen (GABA-B receptor agonist) did not modify the incidence and intensity of dyskinesic movements. Thinking about that blocking GABA-B receptors increases the release of GABA and the dose of L-dopa administered is crucial to the emergence of dyskinesias, we did trials that combined sub-therapeutic doses of L-dopa (5 mg / kg) and used a GABA receptor antagonist (CGP 54626 B or saclofén). We found that with this strategy, the incidence of dyskinesia decreased significantly and maintained an adequate therapeutic effect.

These data indicate that blockade of GABA-B receptors, with the decrease in the dose of L-dopa, would be useful in the management of dyskinesia induced by L-dopa in Parkinson's disease.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 ENFERMEDAD DE PARKINSON.

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo crónico que se caracteriza por la disminución de dopamina debido a la muerte de neuronas dopaminérgicas, lo cual se refleja en síntomas motores como rigidez muscular, bradicinesia, temblor en reposo e inestabilidad postural (Jankovic, 2008; Savitt et al., 2006; Olanow et al., 2009). Los síntomas no motores asociados incluyen deterioro cognitivo, dolor, desordenes del estado de ánimo, trastornos del sueño y demencia (Chaudhuri et al., 2006; Olanow et al., 2009). Los síntomas motores resultan de la degeneración de un 70-80% de las neuronas dopaminérgicas que proyectan de la sustancia nigra hacia el núcleo estriado (*figura 1*). La incidencia de la EP en pacientes de más de 55 años es de aproximadamente el 1-2% en todo el mundo, creando una carga de morbilidad sustancial de la población mundial que envejece (Olanow et al., 2009).



*Figura 1. Cortes horizontales post-mortem del cerebro medio de: un paciente con enfermedad de Parkinson (P) y de una persona sana o control (C), mostrando una pérdida de pigmentación en la Sustancia Nigra compacta en la enfermedad de Parkinson.*

### 1.1.1 FISIOPATOLOGÍA

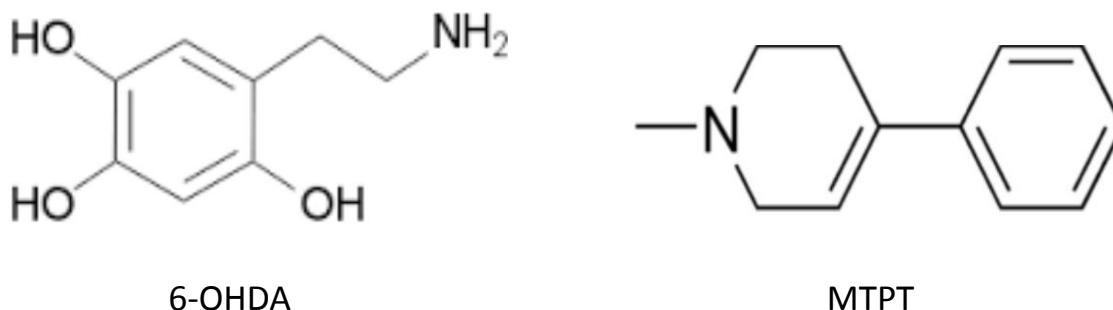
La patología observada en los pacientes con EP incluye la disminución progresiva de neuronas dopaminérgicas en el núcleo cerebral conocido como sustancia nigra pars compacta (SNc), resultando en la disfunción del circuito de los ganglios basales (Dickerson y Conn, 2012; Johnson et al., 2009; Wichmann y DeLong, 1996; Zhang et al, 2005). La etiología y la fisiopatología de la EP todavía no se entienden completamente.

Los tratamientos disponibles para la EP son sólo un alivio sintomático. Las investigaciones actuales sugieren que la predisposición genética, la edad, los factores ambientales, los niveles de hierro y la excitotoxicidad están estrechamente asociados con la patogénesis de la EP, estos posibles factores resultarían en daño excitotóxico, sobrecarga de calcio, disfunción mitocondrial, generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), deposición y distribución anormal de hierro, que posteriormente induce daño oxidativo del ADN, lípidos y proteínas y la pérdida de glutatión, que posteriormente conllevan a alteraciones en el metabolismo de la dopamina, disfunción en el transporte axonal y la inducción de apoptosis neuronal (Olanow y Tatton, 1999; Gandhi y Wood, 2005).

Algunos factores ambientales se han relacionado con un mayor riesgo para padecer EP, por ejemplo el uso del agua en zonas rurales, el uso de pesticidas y algunas ocupaciones como la minería o la soldadura (Farrer, 2006). Aunque muchos genes han sido identificados, el mecanismo exacto en el que la variación de genes ligados a la EP conduce a la neurodegeneración no se entiende completamente, sin embargo algunas investigaciones han señalado a la disfunción mitocondrial, el daño oxidativo, la agregación aberrante de proteínas, y los déficit en la proteólisis mediada por ubiquitina (Olanow et al., 2009). Las terapias actuales son capaces de proporcionar alivio sintomático pero son incapaces de detener la progresión de la enfermedad (Olanow et al., 2009). Una variedad de factores neurotróficos, en particular los de la familia del factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF y neurturina), son prometedores en este sentido en los estudios preclínicos, demostrando sus efectos en modelos de roedores y de primates. Por ejemplo, factor

de crecimiento de fibroblastos (FGF) (Timmer et al, 2007), ha demostrado ser neuroprotector. Otros han demostrado ser neuroprotectores y neurorestauradores en modelos preclínicos de EP; por ejemplo GDNF (Hoffer et al., 1994; Kearns y Gash, 1995; Tomac et al., 1995; Gash et al, 1996;.. Kirik et al, 2004), neurturina (Horger et al., 1998; Rosenblad et al, 1999; Gasmi et al, 2007), así como el factor neurotrófico de la dopamina cerebral (CDNF) (Lindholm et al, 2007; Voutilainen et al, 2011) y el factor neurotrófico mesencefálico derivado de astrocitos (MANF) (Voutilainen et. al., 2009).

Algunas de las características en cuanto a la patología de la EP se han podido reproducir en modelos animales de roedores lesionados con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y primates tratados con la toxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (*figura 2*). Los aspectos bioquímicos, electrofisiológicos e incluso conductuales son fielmente reproducidos en los mencionados modelos, lo que ha permitido diseñar estrategias farmacológicas y clínicas para mejorar la calidad de vida de los pacientes con EP.



*Figura 2. Estructura molecular de 6-OHDA y MPTP*

### 1.1.2 TERAPIA

La enfermedad de Parkinson (PD) es un trastorno neurodegenerativo progresivo asociado con la pérdida de las neuronas dopaminérgicas, lo cual se ve reflejado en el circuito los ganglios basales. La administración oral del precursor de dopamina, L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-dopa) sigue siendo el tratamiento farmacológico de elección para el alivio de la mayoría de los síntomas motores de la EP. Sin embargo, con la progresión de la enfermedad, su eficacia disminuye gradualmente con el tiempo, y después de un número variable de años la mayoría de los pacientes desarrollan discinesia, un efecto secundario que se define como movimientos anormales involuntarios excesivos (Tronci 2014; Prashanth et al., 2011).

La depleción de dopamina está asociada con la enfermedad de Parkinson tanto en la vía directa como en la vía indirecta donde se conduce a la hiperactividad de las proyecciones inhibitorias del núcleo estriado al globo pálido (Hirsch et al., 2000). Esta hiperactividad glutamatérgica de la vía indirecta se cree que contribuye a la disfunción motora (Blandini et al., 2000) y a la pérdida de neuronas dopaminérgicas (Greenamyre y O'Brien, 1991; Przedborski, 2005) en pacientes con EP. Los estudios clínicos y preclínicos en pacientes y modelos animales con EP sugieren que la disminución de la hiperactividad patológica de esta vía indirecta puede ser beneficiosa en la reducción de los síntomas motores asociados con EP.

### 1.1.4 LEVODOPA-CARBIDOPA

El tratamiento de elección para tratar la enfermedad de Parkinson es la L-dopa (Levodopa) (Breger, 2013). La degeneración y muerte de neuronas dopaminérgicas asociadas a la enfermedad de Parkinson representa el principio sobre el cuál se basa el uso de L-dopa en su tratamiento. El razonamiento es simple: la muerte neuronal conlleva a una disminución de la dopamina, por lo tanto, al restaurar la dopamina resultará en una recuperación de la funcionalidad motora. La administración directa de dopamina en los pacientes tiene sus inconvenientes por los efectos periféricos que produce (hipotensión aguda), también su rápido

metabolismo, lo que produce bajas concentraciones en el cerebro. La L-dopa, precursor de la dopamina, resulta ser un mejor candidato y, aunque comparte algunos de los efectos periféricos de la dopamina, estos son con mucho menores. No obstante, permanece un efecto metabólico determinante: descarboxilación fuera del sistema nervioso. El uso de coadyuvantes que inhiben su metabolismo sólo a nivel periférico resuelve el problema. Los coadyuvantes resultan ser los inhibidores de la dopa-descarboxilasa periférica, tales como la carbidopa o la benserazida. Una vez en el cerebro, el precursor debe ser convertido a dopamina y ejercer su efecto activando a sus respectivos receptores. Esto constituye la base de lo se conoce como "mecanismo de acción por reemplazo" (Florán 2005).

## 1.2 GANGLIOS BASALES

Entre las funciones más importantes del Sistema Nervioso Central se encuentra el movimiento voluntario, que es regulado por diversas estructuras entre ellas los Ganglios Basales conformados por el núcleo estriado en sus porciones caudado y putamen, el globo pálido interno o medial (GPi) y externo (GPe), y el núcleo subtalámico (NST), los anteriores localizados en el telencéfalo (figura 3). Finalmente la sustancia nigra reticulada (SNr) y compacta (SNc) estas localizadas en el mesencéfalo. La funcionalidad de estos núcleos es complementada por el tálamo y la corteza (Obeso et al, 2000).



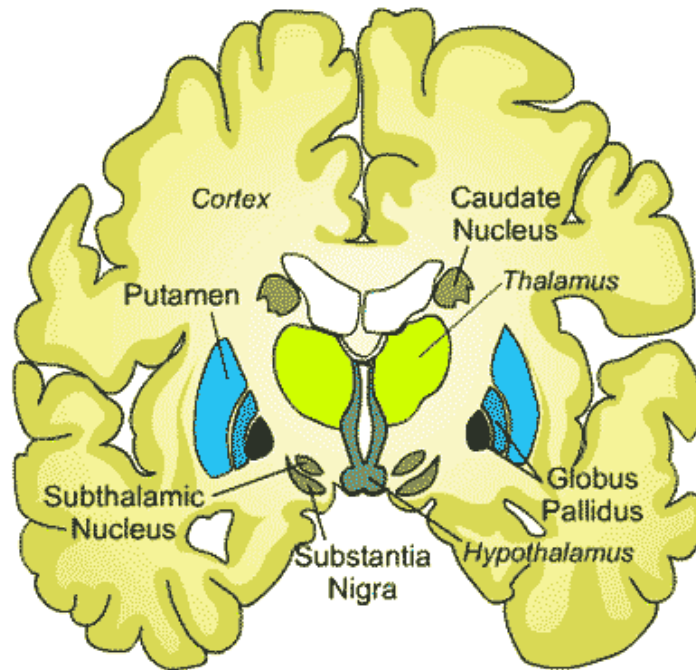


Figura 3. Esquema representativo de la localización anatómica de los núcleos que conforman los Ganglios basales.

### 1.2.1 CIRCUITO DE LOS GANGLIOS BASALES

El conjunto de núcleos de los ganglios basales está encargado de modular el movimiento y está dividido funcionalmente en dos vías: la vía directa, envía la información del núcleo de entrada (estriado) al núcleo de salida (SNr) y la vía indirecta, la información fluye del núcleo de entrada hacia el GPe y NST antes de llegar al núcleo de salida (SNr), que manda información al tálamo y este a la corteza. En la EP la deficiencia de dopamina lleva al remodelamiento funcional de los ganglios basales, la alteración más importante afecta a los núcleos de salida (SNr) y el globo pálido externo (GPe); los cuales tienen una actividad incrementada (Bezard, E., et. al., 2001).

Cuando un individuo quiere realizar un movimiento, el circuito de los ganglios basales (*figura 4*) comienza a actuar, la corteza envía señales excitatorias hacia el

núcleo de entrada de información del circuito: el núcleo estriado, permitiendo la activación de las dos poblaciones neuronales existentes en el núcleo estriado, las de la vía directa y las de la vía indirecta (Bezard, 2001).

Las neuronas en la vía directa proyectan directamente del estriado hacia los núcleos de salida GPi/SNr y proveen de un efecto inhibitorio directo en las neuronas de éstos núcleos (Obeso, 2000), que promueven la actividad del tálamo excitando a las neuronas de la corteza y facilitando la ejecución del movimiento. Las neuronas estriatales en la vía indirecta conectan el estriado con los núcleos de salida vía conexiones sinápticas en el GPe y el NST, donde se inhibe el GPe, se desinhibe el NST y se da la excitación de los núcleos de salida. Inhibiendo de esta forma la actividad del tálamo (Obeso, 2000). La vía directa expresa de forma preferencial a receptores de la familia del tipo D1 y la vía indirecta a receptores de la familia del tipo D2 (Fiorentini C., et al., 2010). Ambas vías promueven un efecto sinérgico sobre la ejecución del movimiento, dicha función se lleva a cabo a través de la modulación en los diferentes receptores dopaminérgicos estratégicamente localizados en este circuito neuronal.

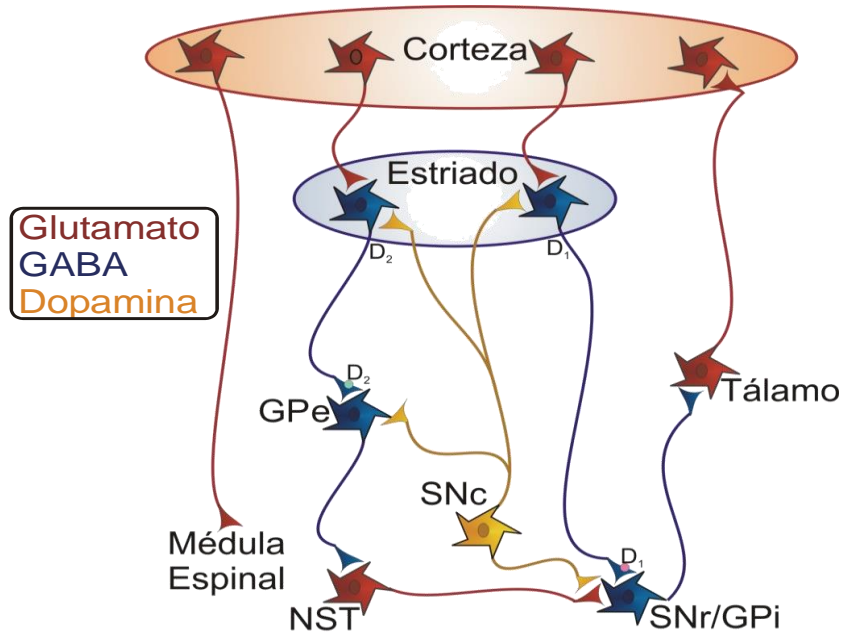
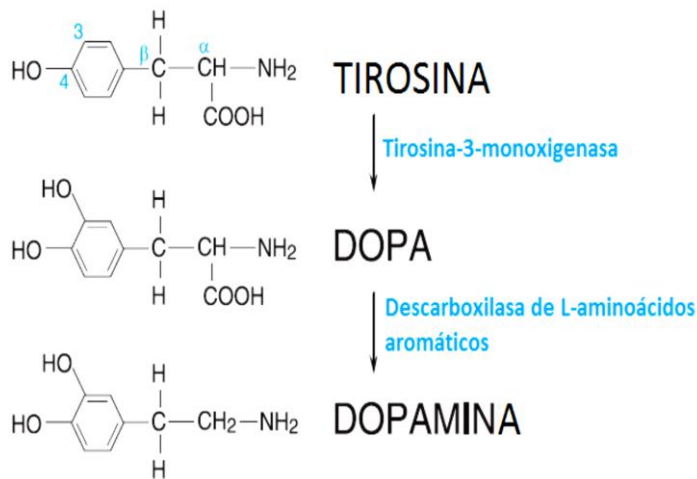


Figura 4. Ilustración de la organización funcional del circuito de los ganglios basales.

## 1.2 DOPAMINA

La dopamina pertenece a un grupo de neurotransmisores llamados catecolaminas. El precursor en la síntesis de dopamina es el aminoácido tirosina. Dos reacciones transforman la tirosina en dopamina: la primera es catalizada por la enzima tirosina hidroxilasa (TH) que convierte tirosina en L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-dopa). La TH es considerada la enzima limitante en esta vía (Feldmen, et. a.l, 1997). El segundo paso es la descarboxilación de DOPA, catalizada por la enzima descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos (DCAA), que finalmente produce dopamina (Hornykiewicz O., 2002) (figura 5). Esta catecolamina controla una variedad de funciones importantes incluyendo actividad locomotora, pensamiento, emociones, recompensa, ingesta de alimento y regulación endócrina; a nivel periférico regula

funciones cardiovasculares, liberación de catecolaminas, secreción hormonal, tono vascular, función renal y motilidad gastrointestinal (Missale C., 1998).



*Figura 5. Síntesis de dopamina. El aminoácido tirosina es hidroxilado mediante la enzima Tirosina hidroxilasa para convertirse en dopa, la cual es convertida a dopamina mediante la acción de la Descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos.*

### 1.2.1 PROYECCIONES DOPAMINÉRGICAS

La dopamina constituye cerca del 80% del contenido de catecolaminas en el cerebro. Las proyecciones originadas desde las áreas del cerebro que sintetizan este neurotransmisor dan lugar a cuatro vías axonales (*figura 6*): 1. Nigroestriatal; 2. Mesolímbica; 3. Mesocortical y 4. Tuberoinfundibular.

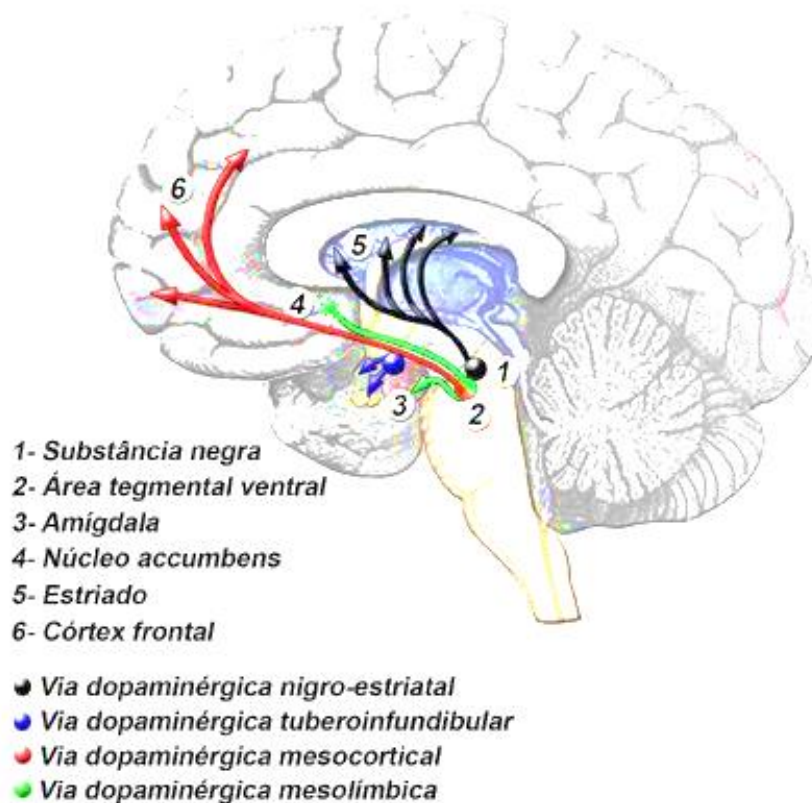


Figura 6. Vías dopaminérgicas en el cerebro de mamíferos.

Las proyecciones que constituyen la vía nigroestriatal provienen de las neuronas que sintetizan dopamina del núcleo del cerebro medio, la sustancia nigra compacta (SNc) que inerva el estriado dorsal (caudado-putamen). Ésta vía está involucrada en el control del movimiento, y su degeneración desencadena la enfermedad de Parkinson (Gerfen, 1992; Lang, Lozano, 1998). La vía mesocortical se origina en el área ventral tegmental (VTA) e inerva diferentes regiones de la corteza frontal. Esta vía participa en algunos aspectos límbicos como memoria y aprendizaje (Feldmen, et. al., 1997; Le Moal, 1991). La vía mesolímbica parte desde el área ventral tegmental del mesencéfalo e inerva al estriado ventral (núcleo accumbens), al tubérculo olfatorio (TO) y partes del sistema límbico (Feldmen, et. al., 1997). Ésta vía se ha visto que se encuentra implicada en mecanismos de motivación y

recompensa (Koob, 1992; Koob, 1988). La vía tuberoinfundibular tienen origen en las células del núcleo periventricular y del núcleo arqueado del hipotálamo y proyectan hasta la eminencia media o región infundibular que es la región más inferior del hipotálamo (Feldman, et. al., 1997). La dopamina transportada a la pituitaria anterior o adenohipófisis actúa en los lactotrofos para regular la secreción de prolactina (Doopler, 1994).

### 1.2.2 RECEPTORES A DOPAMINA

La dopamina ejerce su acción mediante su unión específica a receptores membranales (Gingrich y Caron, 1993), los cuales pertenecen a la familia de receptores de siete dominios transmembranales (7TM) acoplados a proteínas G (GPCRs).

Cinco distintos receptores para dopamina han sido identificados, caracterizados y subdivididos en dos subfamilias, receptores a dopamina del tipo D1 y receptores a dopamina del tipo D2, con base en sus propiedades bioquímicas y farmacológicas. La familia del tipo D1 incluye a los receptores D1 y D5, mientras que la familia tipo D2 incluye a los receptores D2, D3 y D4 (Fiorentini C., et. al., 2010).

Las vías de señalización activadas por receptores dopaminérgicos son numerosas, sin embargo, los efectos mejor descritos son la activación o inhibición de la adenilato ciclasa y la modulación de  $Ca^{2+}$  en las neuronas (*tabla 1*).

| Efactor                          | Tipo D1 |    | Tipo D2 |    |    |
|----------------------------------|---------|----|---------|----|----|
|                                  | D1      | D5 | D2      | D3 | D4 |
| Adenilato ciclasa                | +       | +  | -       | -  | -  |
| Hidrólisis de fosfolípidos       | +       | ?  | +       |    |    |
| Liberación de ácido araquidónico |         |    | +       |    | +  |
| Canales de $Ca^{2+}$             |         |    | -       | -  |    |
| Canales de $K^+$                 |         |    | +       | ?  |    |
| Intercambio $Na^+/K^+$           |         |    | +       | +  | +  |
| Recaptura de [ $^3H$ ]timidina   | ?       | ?  | +       | +  |    |

Símbolos: +, estimulación; -, inhibición; ?, sugerido por algunas evidencias

*Tabla 1. Los principales segundos mensajeros participantes en las vías de señalización de los receptores dopaminérgicos.*

## *-FAMILIA TIPO D2*

A diferencia de la familia de receptores de tipo D1, los receptores de la familia tipo D2 inhiben la actividad de la enzima adenilato ciclasa (Vallone, et. al., 2000)

La clonación del gen del receptor **D2** reveló la presencia de múltiples exones e intrones, una característica usual de los receptores acoplados a proteínas G (Lefkowitz and Caron 1988), muchos grupos han identificado dos isoformas del receptor D2 derivadas por splicing alternativo de un solo gen. ((Dal Toso *et al.*, 1989; Giros *et al.*, 1989; Monsma *et al.*, 1989; Chio *et al.*, 1990).). Éstos solo se diferencian por la inserción de 29 aminoácidos en el tercer loop intracelular y son nombrados D2 corto y D2 largo.

Subsecuentemente, los genes codificantes para los otros dos miembros de la familia de receptores tipo D2, **D3** y **D4**, mostraron que en su secuencia contenían intrones y compartían una complejidad similar en su estructura genómica. Las variantes de splicing para el gen del receptor D3 han sido detectadas por RT-PCR (Sokoloff *et al.*, 1990; Giros *et al.*, 1991).

En 1993, Fishburn y colaboradores reportaron la existencia de una variante más corta del receptor D3 a la que le faltan 21 aminoácidos localizados en el tercer loop citoplasmático con respecto a la isoforma previamente identificada. La dos isoformas del receptor D3 están expresadas en las mismas regiones cerebrales, comparten el mismo perfil farmacológico y son muy probablemente derivados por splicing alternativo del mismo gen.

El gen del receptor D4 ha mostrado ser el único miembro de la familia de receptores acoplados a proteínas G en tener variaciones alélicas en la población humana. La isoforma que contiene cuatro repetidos es predominante en humanos, pero también se han encontrado isoformas que contienen más de 11 de estos repetidos (Van Tal *et al.*, 1991; O'Malley *et al.*, 1992). Estas formas muestran pequeñas diferencias en su afinidad por el neuroléptico atípico clozapina, pero ninguna parece ser asociada con la incidencia de esquizofrenia (Shaikh *et al.*, 1994).

### *-FAMILIA TIPO D1*

Los receptores de la familia D1 son reguladores positivos de la adenilato ciclasa (AC) y por lo tanto incrementan los niveles de AMPc. Su estimulación resulta en la activación de la protein cinasa A (PKA), la cual fosforila proteínas citoplasmáticas y nucleares, regula el metabolismo celular, incluyendo la función de los canales iónicos y además desensibiliza los receptores transmembranales acoplados a proteínas G conduciendo a la respuesta celular para la liberación de neurotransmisor (Choi, et. al., 1993, Hofmann et. al., 1994)

Basado en la secuencia del cDNA del receptor D2 clonado, el primer receptor clonado de la familia de receptores tipo D1, fue el receptor **D1**. Fue identificado independiente y casi simultáneamente por cuatro grupos (Deary *et al.*, 1990; Sunahara *et al.*, 1990; Zhou *et al.*, 1990; Monsma *et al.*, 1990).

En células transfectadas, el perfil farmacológico del receptor clonado fue el ya conocido para el receptor D1. Tiene una alta afinidad por SCH 23390 y una baja afinidad por antagonistas específicos para D2 tales como la espiperona. Como era esperado, la activación de este receptor incrementa los niveles de AMPc (Grandy *et al.*, 1991).

Conociendo la homología entre los miembros de la familia de receptores acoplados a proteínas G, otro receptor fue clonado en rata (D1b) (Tiberi *et al.*, 1991) y humano (D5) (Grandy *et al.*, 1991; Sunahara *et al.*, 1991; Weinshank *et al.*, 1991). D1 y D5 comparten muy alta homología entre sus dominios transmembranales, la región que está implicada en el reconocimiento de ligando. Por lo tanto no sorprende que estos dos receptores comparten un perfil farmacológico similar. Sin embargo, tienen características que los distinguen, el receptor D5 posee una afinidad 10 veces mayor por dopamina y 20 veces menor afinidad por espiperona que el receptor D1.

#### 1.4 L-DOPA Y LAS DISCINESIAS.

El tratamiento de elección para la EP es la L-dopa que al ser transformada a dopamina, modula nuevamente ambas vías y genera un efecto terapéutico adecuado reflejado en la correcta ejecución del movimiento, sin embargo la L- dopa



tiene como principal efecto adverso las discinesias (movimientos involuntarios anormales) (Katz, 2005).

Entre los muchos cambios de los circuitos de los ganglios basales asociados a la discinesia, se ha visto que en terminales y el soma de las neuronas estriado-nigrales de ratas lesionadas con 6-hidroxidopamina que presentan discinesias severas a causa del tratamiento con L-dopa, existe un incremento en la vía de señalización del receptor D1, siendo responsable de ello en parte la enzima adenilato ciclasa presente en esta vía de señalización, encontrándose un incremento en los niveles de expresión y actividad de la proteína, tal suceso provoca una liberación masiva de GABA a nivel de la SNr lo que produce un incremento en el movimiento, facilitando la aparición de discinesias, explicando así en parte las anomalías en el movimiento voluntario del individuo (Rangel-Barajas, et. al., 2011).

## 1.5 RECEPTORES GABAÉRGICOS.

El ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA) ejerce una acción inhibitoria en el SNC, en el cual se encuentra ampliamente distribuido. Su desbalance puede asociarse a cuadros como la depresión; su adecuado balance constituye la base de importantes acciones farmacológicas. Su síntesis se da a partir del ácido glutámico, por medio de la ácido glutámico decarboxilasa, la cual es el paso limitante de la síntesis. Se metaboliza a semialdehído succínico, el cual es regenerado a ácido glutámico. Este neurotransmisor inhibitorio activa las tres clases principales de receptores para GABA denominados GABA-A, GABA-B y GABA-C. Estos receptores poseen características diferentes: los receptores GABA-A y GABA-C son ionotrópicos, mientras que los receptores GABA-B son de tipo metabotrópico (Chebib, 1999).

### 1.5.1 RECEPTORES GABA-B

Los receptores GABA-B fueron clonados a finales de los 1990 (Kaupmann et al., 1997). En su forma funcional, están compuestas por las isoformas de las subunidades GABAB1a o GABAB1b que heterodimerizan con una subunidad GABAB2 para formar el receptor heterodimérico GABAB(1a,2) o GABAB(1b,2) (Bettler et al., 2004).

Los heterodímeros GABAB1a-GABAB2 existen predominantemente como receptores presinápticos, mientras que GABAB1b-GABAB2 existen como receptores postsinápticos (Bischoff et al., 1999; Kulik et al., 2003).

Los receptores GABA-B han sido identificados en el sistema nervioso central (SNC), sistema nervioso periférico así como en una variedad de órganos periféricos. En el SNC, las regiones con la mayor expresión de receptores GABA-B son el hipocampo, núcleo talámico, cerebelo, amígdala, neocorteza y habénula. También se han encontrado en densidades más bajas en áreas subcorticales, hipotálamo y en la espina dorsal.

Las subunidades GABAB1 y GABAB2 están expresadas mayormente en neuronas, sin embargo, también se han detectado en células gliales (Lopez-Bendito et al., 2004; Luján and Shigemoto, 2006). Mediante microscopia electrónica combinada e inmunohistoquímica de alta resolución se han localizado receptores GABA-B dentro de las espinas y ejes de las dendritas correspondientes con la ubicación de las terminales GABAérgicas (los receptores GABA-B funcionan como autorreceptores) y las sinapsis glutamatérgicas (los receptores GABA-B funcionan como heterorreceptores) (Kulik et al., 2003, 2006).

La localización de los genes y el fenotipo knock-out de los receptores GABA-B se muestran en la *tabla 2*. Los receptores GABA-B están involucrados en varios eventos fisiológicos y patofisiológicos, tales como la espasticidad, dolor, función cognitiva, ansiedad, desordenes de comportamiento, epilepsia y adicción a drogas (Cryan and Slattery, 2010; Filip et al., 2007; Filip and Frankowska, 2007, 2008; Froestl, 2010; Vlachou and Markou, 2010).

| RECEPTORES GABA <sub>B</sub>       |  |  |
|------------------------------------|--|--|
| SUBUNIDADES                        | GABA <sub>B1</sub>   | GABA <sub>B2</sub>   |
| ISOFORMA                           | GABA <sub>B1a</sub><br>GABA <sub>B1b</sub><br>GABA <sub>B1c-k</sub>  |  |
| LOCALIZACIÓN DEL GEN               | 6p21.3 (humano); 20p12 (rata); 17.19bcM (ratón)  | 9q22.1-q22.3 (humano); 5q22 (rata); 481 (ratón)  |
| ESTRUCTURA PROTEICA                | 960-844 aminoácidos (rata)   | 941 aminoácidos (rata)   |
| PRINCIPAL VÍA DE SEÑALIZACIÓN      | G <sub>i/o</sub> inhibición de la activación de la adenilato ciclasa y de la formación de AMPc, inhibición de canales de calcio dependientes de voltaje N/P/Q (presinápticos) y de canales de potasio rectificadores de entrada (postsinápticos) |  |
| DISTRIBUCIÓN EN EL CNS DE ROEDORES |  |  |
| ANATÓMICA                          | Hipocampo, núcleo talámico, cerebelo, amígdala, neocorteza, habenula, sustancia nigra, área ventral tegmental, núcleo acumbens, globo pálido, hipotálamo, medula espinal   |  |
| NEURONAL                           | Autorreceptores (terminales GABAérgicas)<br>Heterorreceptores (soma, axones y terminales glutamatérgicas y dopaminérgicas)   |  |
| FENOTIPO KNOCK-OUT                 |  |  |
| FARMACOLOGÍA                       | Ausencia de unión de agonistas y antagonistas de activación de proteína G  | Reducción de unión de agonistas y antagonistas, ausencia de activación de proteína G   |
| FISIOLOGÍA                         | Desinhibición/ausencia de LTP, ausencia de receptores presinápticos  | ausencia de receptores presinápticos   |
| COMPORTAMIENTO                     | Conducta circular estereotipada, fase retardada del sueño, actividad proconvulsivante, hiperalgesia, hiperlocomoción, deterioro de la memoria, ansiedad inactiva en ansiolíticos, conducta tipo antidepresiva                                    | Conducta circular estereotipada, fase retardada del sueño, actividad proconvulsivante, hiperalgesia, hiperlocomoción, deterioro de la memoria, ansiedad, conducta tipo antidepresiva |

*Tabla 2. Caracterización de los receptores GABA-B: estructura molecular, vías de señalización, localización y fenotipo de ratones knock-out.*

La regulación de la excitabilidad neuronal a través de los receptores GABA-B puede ocurrir por tres distintos mecanismos:

- Los niveles de AMPc en la célula pueden ser regulados por la activación de los receptores GABA-B a través de las proteínas G<sub>ai</sub> y G<sub>ao</sub> que inhiben a las isoformas I, III, V y VI de la adenilato ciclasa, o bien de manera positiva a través del complejo G<sub>βγ</sub> que estimula a las isoformas II, IV y VII. Este último efecto depende de la presencia de la proteína G<sub>as</sub>.
- En diversas preparaciones, los receptores GABA-B tienen sus efectos presinápticos a través de una inhibición dependiente de voltaje de los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo N (Cav2.2) o tipo P/Q (Cav2.1). La activación de estos canales promueve

la liberación de neurotransmisores desde la presinapsis. Los receptores GABA-B inducen una corriente inhibitoria postsináptica a través de la activación de los canales de potasio rectificadores entrantes (GIRK o Kir3), lo que resulta en una hiperpolarización.

– Los receptores GABA-B se presentan como un heterodímero formado por subunidades designadas como GABAB1 y GABAB2. Ambas subunidades tienen un alto peso molecular (110 kDa), siete dominios transmembranales y una larga cadena extracelular en su N-terminal. La subunidad GABAB2 no sólo permite que la subunidad GABAB1 alcance la superficie celular, sino que parece ser el sitio de unión con la proteína G, mientras que la subunidad GABAB1 es necesaria para la activación del receptor por el agonista, esto es, la unión de GABA u otros agonistas a GABAB1 conlleva a la activación de la proteína G a través de GABAB2. Precisamente, las isoformas de los receptores GABA-B más estudiadas, abundantes y altamente conservadas entre especies son GABAB1a y GABAB1b (Cortés C., et. al., 2011).

## **2. ANTECEDENTES DIRECTOS**

### **2.1 RELACIÓN DE LOS RECEPTORES D1 CON LOS RECEPTORES GABA B.**

Los receptores para dopamina del tipo D1 modulan la transmisión de varios neurotransmisores en los ganglios basales, regulando de esta manera la función motora (Gefren, 2003). Los receptores D1 facilitan la actividad de la vía directa actuando tanto en el estriado como en el núcleo de salida, la sustancia nigra pars reticulata (SNr) y el núcleo entopeduncular. En el estriado incrementan la excitabilidad de las neuronas estriado-nigrales y la entrada glutamatérgica a éstas neuronas. En el núcleo de salida, los receptores D1 incrementan la liberación de GABA y su transmisión, promoviendo la locomoción y mediando los efectos de la L-dopa en ratas hemiparkinsonicas (Aceves, et. al., 1991). Los ganglios basales tienen

una gran densidad de sitios de unión de GABA-B. El estriado y la sustancia nigra tienen la mayor densidad (Bowery, et. al., 1999), sugiriendo que éstos también pueden regular el flujo de información a través de la vía directa. En el estriado, los receptores GABA-B presinápticos en terminales glutamatérgicas provenientes de la corteza y el tálamo modulan la salida cortical y talámica hacia las neuronas estriatales (Lacey, et. al., 2005). Además, los receptores GABA-B modulan la liberación de dopamina y su síntesis. En la SNr los receptores GABA-B de las terminales estriado-nigrales regulan la liberación de GABA. Los receptores de dopamina D1 y los receptores GABA-B co-localizan en los axones de la vía directa en la SNr. Los receptores D1 incrementan, mientras que los GABA-B inhiben la liberación de GABA y su transmisión. Ambos receptores controlan la entrada sobre la misma neurona de la SNr (Misgeld, 2004). Los receptores D1 son activados tónicamente por dopamina endógena (Aceves et al., 1995; Radnikow and Misgeld, 1998) y los receptores GABA-B por GABA endógeno (Windels and Kiyatkin, 2006).

En 2003 Nava y cols. encontraron que la activación de los receptores GABA-B inhibe la liberación de [<sup>3</sup>H]GABA inducida por despolarización en rebanadas de SNr. Esta inhibición es prevenida por la depleción de dopamina y por el bloqueo de los receptores D1, lo que implica un control de los receptores GABA-B por parte de los receptores D1 (Nava, 2007), además esta acción ocurre a nivel de la adenilato ciclasa ya que los agonistas de receptores GABA-B previenen también la estimulación de la liberación estimulada por activación directa de la enzima con forskolina, pero no de la PKA con 8-Br-AMPC.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La enfermedad de Parkinson continúa siendo un problema de salud de importancia mundial y a pesar de la búsqueda por contribuir a mejorar la calidad de vida de los pacientes, las medidas terapéuticas actuales no han sido suficientes. Se requieren nuevas alternativas terapéuticas basadas en la fisiopatología de la enfermedad para el manejo de estos pacientes. La L-dopa continúa siendo la mejor opción para restaurar el movimiento en los pacientes, sin embargo, su uso se ha limitado debido

a los efectos colaterales que desencadena, como son los movimientos involuntarios anormales, en especial las discinesias. En este trabajo se aborda una estrategia cuyo objetivo es reducir o prevenir estos problemas y de ésta manera continuar el uso de la L-dopa como fármaco de elección mejorando así la calidad de vida de los pacientes.

Dado que a la discinesia inducida por L-dopa se ha asociado el aumento de la señalización del receptor D1 y actividad de la adenilato ciclasa en neuronas estriado-nigrales lo que conlleva a aumentos de la liberación de GABA que explica los movimientos anormales, en este proyecto queremos explorar el posible uso terapéutico que podrían tener los fármacos con acción sobre receptores de GABA tipo B, ya que en estas neuronas se ha mostrado que son capaces de antagonizar la actividad de receptores D1 a través de inhibir la actividad de la enzima adenilato ciclasa. Para ello estudiaremos in vitro la interacción entre receptores D1 y GABA-B sobre la liberación de GABA en condiciones de denervación dopaminérgica, la activación de los receptores D1 la haremos con agonistas selectivos, y la de los receptores GABA-B con agonistas y antagonistas selectivos. También estudiaremos el uso de agonistas o antagonistas de los receptores GABA-B en el control de las discinesias inducidas por L-dopa en un modelo de Parkinson experimental.

#### **4. HIPÓTESIS**

Los receptores GABA-B modulan la liberación de GABA en las terminales estriado-nigrales interactuando con receptores D1 en la denervación dopaminérgica.

Los fármacos selectivos de los receptores GABA-B son útiles en el manejo de las discinesias inducidas por L-dopa en el Parkinson experimental.

## **5. OBJETIVO**

Estudiar la interacción entre receptores GABA-B y D1 en el control de la liberación de GABA en las terminales estriado-nigrales en el Parkinson experimental y evaluar el posible uso terapéutico de fármacos con acción selectiva sobre receptores GABA-B en el manejo de las discinesias inducidas por el tratamiento con L-dopa.

### **5.1 OBJETIVOS PARTICULARES**

Estudiar la interacción D1/GABA-B sobre la liberación de [<sup>3</sup>H]GABA radiactivo en la sustancia nigra pars reticulata de ratas con denervación dopaminérgica.

Evaluar el efecto de agonistas y/o antagonistas de receptores de GABA tipo B sobre las discinesias inducidas por L-dopa en un modelo de Parkinson experimental.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 ANIMALES**

Para todos los experimentos realizados se emplean ratas macho, cepa Wistar, de entre 200 y 230 g de peso. Los animales fueron manejados en condiciones de habituación de bioterio: temperatura ambiente entre 18-23 °C, en ciclo de luz-obscuridad de 12 horas, hidratación y alimentación ad libitum.

### **6.2 LESIÓN CON 6-HIDROXIDOPAMINA**

Se utiliza un modelo de Parkinson experimental inducido mediante la inyección de 1µl de 6-hidroxidopamina (6-OHDA 16 µg/µl disuelta en solución salina 0.9% y ácido ascórbico 0.1%) al inyectar esta neurotoxina en el haz del cerebro medio, se induce la muerte de neuronas dopaminérgicas. Los animales fueron sometidos a anestesia

administrando por vía intraperitoneal una mezcla de ketamina-xilacina en proporción 3:1. Los animales fueron anestesiados con Ketamina (112.5 mg/Kg) y Xilacina (22.5 mg/Kg) intraperitoneal.

Previo a la cirugía, los animales fueron administrados con imipramina (10 mg/kg) con el fin de proteger las neuronas noradrenérgicas. La cirugía se realizó haciendo uso de un aparato estereotáxico con el cual se localizaron las coordenadas del blanco de la microinyección de la toxina: el haz del cerebro medio, reportadas en el atlas anatómico Paxinos y Watson de 1986. Las coordenadas fueron -1.8 mm anteroposterior, 2.4 mm lateral y 7 mm dorsoventral. La microinyección se llevó a cabo de manera unilateral a una velocidad de 0.1 microlitro / min.

### 6.3 CONDUCTA DE GIRO

Después de 8 días de realizada la cirugía, se llevó a cabo la prueba conductual de giro para corroborar el grado de lesión, la conducta de giro fue inducida por una inyección intraperitoneal de anfetamina (8 mg/Kg). Se seleccionaron todos los animales que presentaron al menos 8 giros ipsilaterales por minuto durante una hora para los estudios posteriores.

### 6.4 EXPERIMENTOS PARA MEDIR LA LIBERACIÓN DE GABA RADIATIVO

Se obtuvieron rebanadas de cerebro de 300 micras de espesor con ayuda de un vibrátomo. Las rebanadas se colocaron en un portaobjetos frío y se disecaron la SNr y el núcleo estriado bajo microscopia estereoscópica. Las muestras microdisecadas se colocaron en un tubo de ensayo con 2ml de solución Krebs Henseleit (KH) a 37 grados por 30 minutos (Florán et al., 1988). El tejido obtenido durante la disección es incubado durante 20-25 min en solución KH, a temperatura ambiente, para su estabilización. Posteriormente el tejido se incubó durante 30 min con solución KH al que se le agregó [<sup>3</sup>H]GABA con ácido aminoxiacético para evitar la degradación de la marca radiactiva. Transcurrido el tiempo de incubación el tejido fue colocado en cámaras de perfusión, en donde se les hace circular solución fisiológica KH



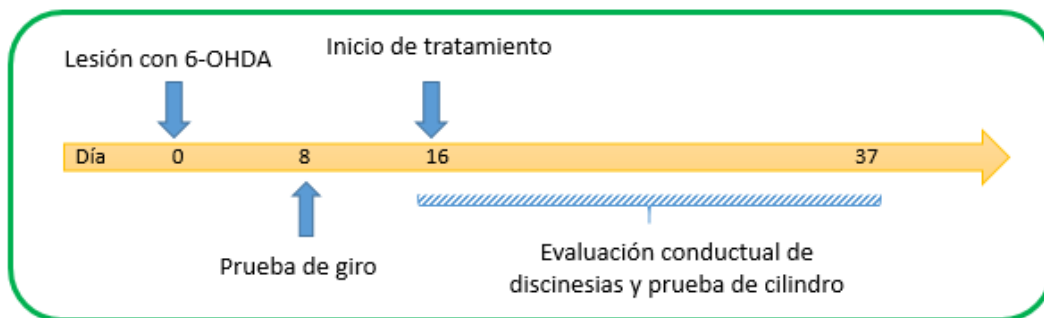
mediante una bomba peristáltica. Se agruparon las cámaras para establecer las condiciones de interés para cada experimento. Mediante una solución con alta concentración de  $K^+$  (15 mM) se generó la condición despolarizante en el tejido.

La liberación de [ $^3H$ ]GABA es cuantificada mediante la colecta de 10 fracciones en intervalos de 4 min. Estas fracciones se recuperan para luego ser colocadas en un contador de centelleo líquido (Beckman Coulter LS 6500) para medir la radiactividad por cada fracción, expresada como el cociente de la radiactividad presente por fracción sobre la radiactividad presente en el tejido.

## 6.5 TRATAMIENTO CON L-DOPA Y FÁRMACOS CON ACCIÓN SOBRE RECEPTORES GABA B

Ocho días después de la prueba de giro, se inició el tratamiento con L-dopa (*figura 7*). La L-dopa se preparó con bencerasida (15 mg/Kg) y se administró vía ip. a una dosis de 10 mg/Kg. A partir del día 11 del tratamiento se administró baclofen (4 mg/Kg) o CGP54626 (antagonista selectivo de los receptores GABA-B) a una dosis de 0.1 mg/kg previo a la administración de L-dopa.

En otro grupo de animales se realizó otro tratamiento en el cual se administró saclofen (antagonista de los receptores GABA-B) a una dosis de 0.1 mg/Kg. A la mitad del lote de animales se administró L-dopa a 5 mg/Kg y al resto se administró L-dopa a 10 mg/Kg. Además a manera de controles se realizaron tratamientos en los cuales se administró únicamente L-dopa en dosis de 5 mg/Kg y de 10 mg/Kg.



*Figura 7. Cronograma de experimentos a partir del día de la lesión.*

## 6.6 EVALUACIÓN CONDUCTUAL DE DISCINESIAS

Las discinesias se evalúan de una manera topográfica en los siguientes tipos: discinesia locomotora (incremento de actividad motora del lado contrario a la lesión cuantificada en giros), discinesia axial (torsión de cuello), discinesia orolingual (registrado como movimientos estereotipados de masticación al vacío y protrusión de la lengua) y discinesia de extremidades (postura distónica de las extremidades inferiores y torsión de la pata trasera contralateral a la lesión).

Las discinesias se registraron los días impares de tratamiento. Los puntajes asignados fueron: (0) si no presenta la discinesia, (1) si la presenta de manera ocasional menos de la mitad del tiempo de observación, (2) presenta la discinesia la mitad del tiempo, (3) la discinesia se presenta más de la mitad del tiempo de observación y se suprime con estímulos sensoriales y (4) si el animal la presenta todo el tiempo y no se suprime con estímulos sensoriales. Con base en estudios previos del laboratorio se separaron las ratas de acuerdo al nivel de discinesias que presentaron (Rangel, 2011). Las ratas que obtuvieron un puntaje de 0 a 31 se denominaron no discinéticas, y las ratas con puntajes mayores a 31 se denominaron discinéticas.

## 6.7 PRUEBA DEL CILINDRO

La prueba de conducta del cilindro se realizó los días pares de tratamiento, 30 minutos después de la inyección del o los fármacos, los animales fueron colocados en un cilindro de acrílico transparente de 20 cm de diámetro por 30 cm de alto. Se colocaron los cilindros bajo la perspectiva de una cámara y fueron videograbadas por 30 minutos. Con los videos obtenidos, se cuantificaron los toques de las patas de cada animal sobre las paredes del cilindro haciendo distinción del toque realizado por la extremidad ipsilateral y el realizado por la extremidad contralateral a la lesión, de manera que al final se realizó un cociente entre los toques de la extremidad contralateral y los toques de la extremidad ipsilateral, obteniendo el índice de asimetría.

Este índice indica la relación del uso de la extremidad que rige el lado lesionado con respecto al lado sano.

## 6.8 SOLUCIONES EMPLEADAS

Krebs normal: NaCl (124.5 mM), KCl (3 mM), MgSO<sub>4</sub> (1 mM), KH<sub>4</sub>PO<sub>4</sub> (1.2 mM), CaCl<sub>2</sub> (1.8 mM), NaHCO<sub>3</sub> (16.5mM), Glucosa (11 mM) a un pH de 7.4.

Krebs alto potasio: NaCl (112.5 mM), KCl (15 mM), MgSO<sub>4</sub> (1 mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1.2 mM), CaCl<sub>2</sub> (1.8 mM), NaHCO<sub>3</sub> (16.5 mM), Glucosa (11 mM) a un pH de 7.4.

Solución salina: NaCl 0.9%.

Solución de ácido ascórbico: NaCl 0.9% y Ácido ascórbico 0.1%.

## 6.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

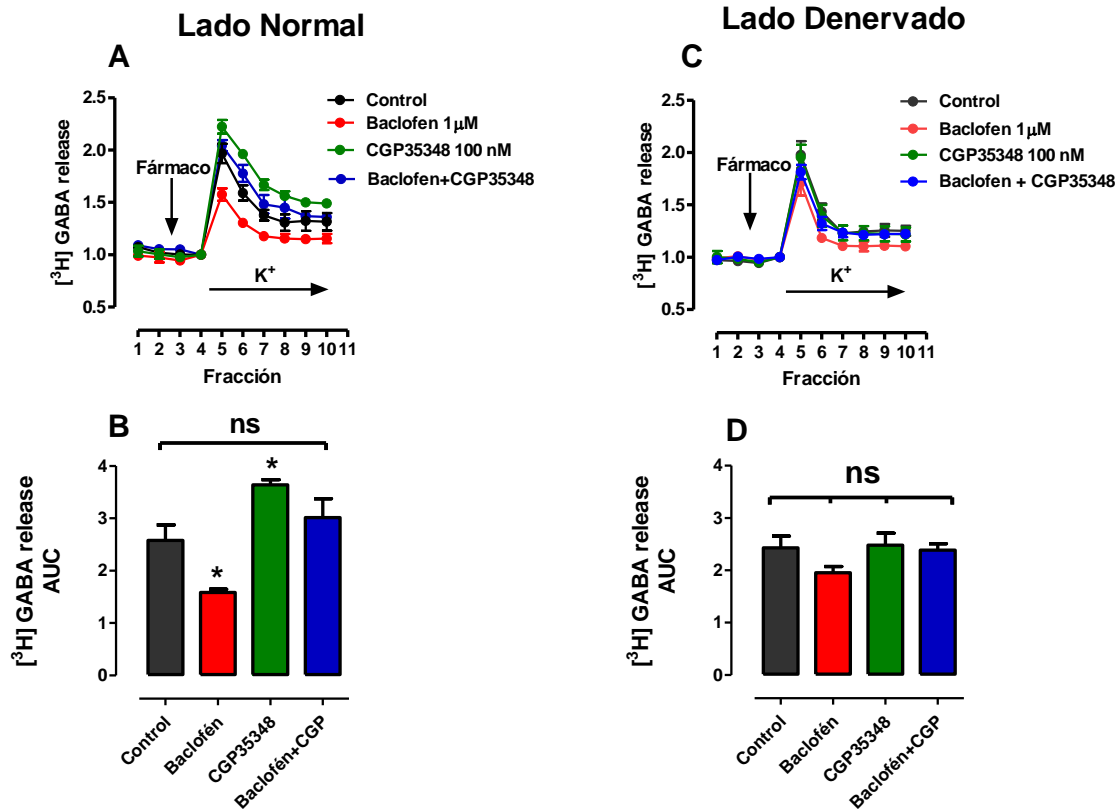
El análisis estadístico se realizó con ayuda del software Prism GraphPad 5. Para los experimentos de liberación de [<sup>3</sup>H]GABA se realizó ANOVA de un factor para probar la significancia del efecto del fármaco. Cuando los experimentos generaron valores significativos ( $p < 0.5$ ), se procedió a realizar una prueba post-hoc de Tukey. Para los experimentos conductuales, se realizó ANOVA de dos vías. El análisis post-hoc se realizó mediante la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. La significancia estadística se estableció en  $p < 0.05$ .

# 7. RESULTADOS

## 7.1 ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE LOS RECEPTORES D1 Y LOS RECEPTORES GABA-B SOBRE LA LIBERACIÓN DE [<sup>3</sup>H]GABA EN RATAS CON DENERVACIÓN DOPAMINÉRGICA

Los resultados correspondientes al estudio de la interacción del receptor D1 y el receptor GABA-B sobre la liberación de [<sup>3</sup>H]GABA en la SNr de ratas con

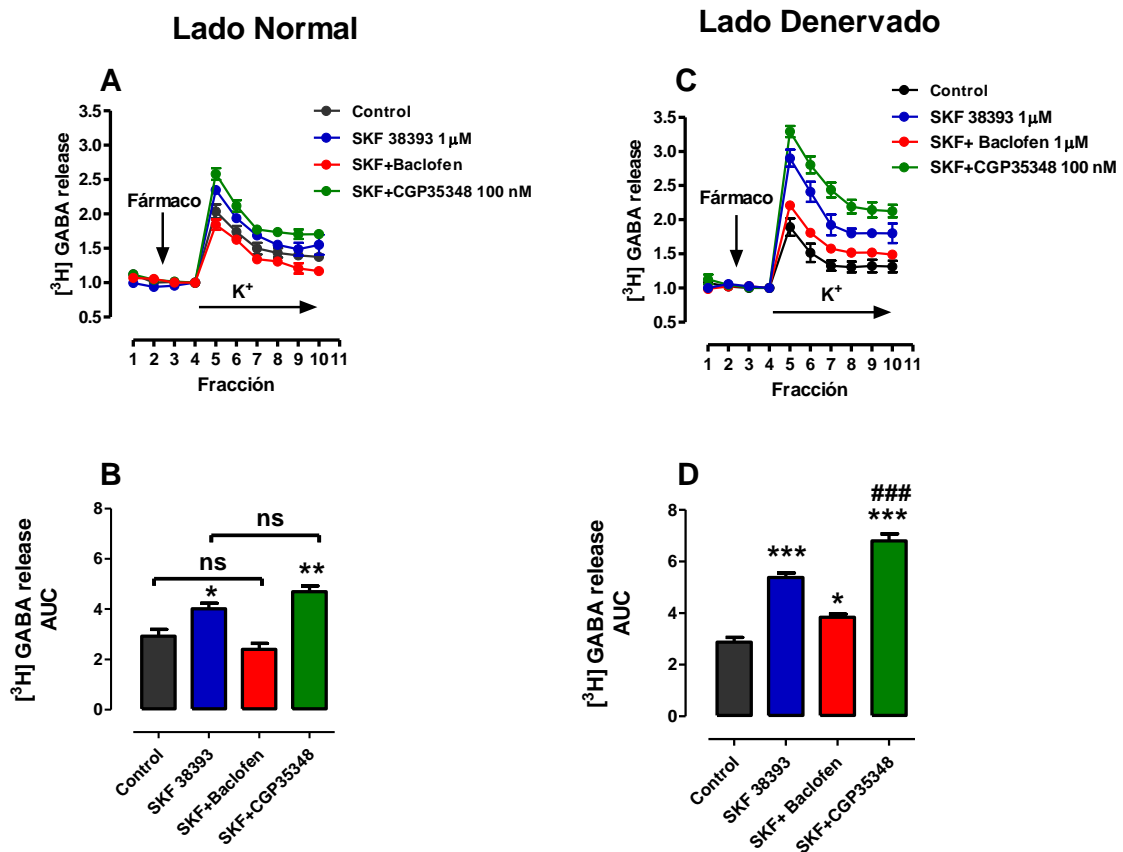
denervación dopaminérgica se muestran en la *figura 8* donde se evaluó el efecto de fármacos con acción sobre los receptores GABA-B (Baclofén: agonista, CGP 35348: antagonista) sobre la liberación.



**Figura 8.** Efecto de los agonistas y antagonistas de los receptores GABA-B sobre la liberación de  $[^3\text{H}]\text{GABA}$  en la sustancia nigra pars reticulata de ratas con denervación dopaminérgica. **A** y **C** muestran el curso temporal de las respuestas. La flecha vertical indica el tiempo cuando se inicia la perfusión de los fármacos, la línea horizontal indica el inicio de la perfusión con la solución de 20 mM de  $\text{K}^+$ . En **C** y **D** se resume la magnitud de los efectos. Todos los valores están expresados como promedio  $\pm$  error estándar. ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey. ns: no hay diferencia significativa.  $*p < 0.05$  vs control. Tres experimentos idénticos fueron realizados y los resultados fueron agrupados. Cada experimento se realizó en rebanadas de 4 ratas con denervación dopaminérgica

En el lado normal, baclofén inhibe la liberación de  $[^3\text{H}]\text{GABA}$  con respecto al control, en cambio CGP 35348 facilita la liberación y al colocar ambos fármacos, la liberación es similar al control (*figuras 8A* y *8B*). En el lado denervado se observa una reducción no significativa de la liberación de GABA por acción del baclofen (*figuras 8C* y *8D*). En la *figura 9* se evaluó el efecto que tienen los fármacos con

acción sobre receptores GABA-B pero activando previamente a los receptores D1 con SKF 38393. En el lado normal se observa que al colocar SKF 38393 la liberación se ve incrementada con respecto al control, al colocar SKF 38393 + baclofén se observa que la liberación es similar al control. Y al activar a los receptores D1 y colocar el antagonista CGP 35348 la liberación tiende a ser mayor que con el SKF 38393 solo pero no alcanza significancia estadística (*figuras 9A y 9B*). En el lado denervado al activar a los receptores D1 la liberación aumenta aún más que en la condición control, y en este caso el baclofén previene el efecto de la activación del receptor D1, y de manera interesante el antagonista CGP 35348 potenció el efecto del SKF 38393 (*figuras 9C y 9D*).



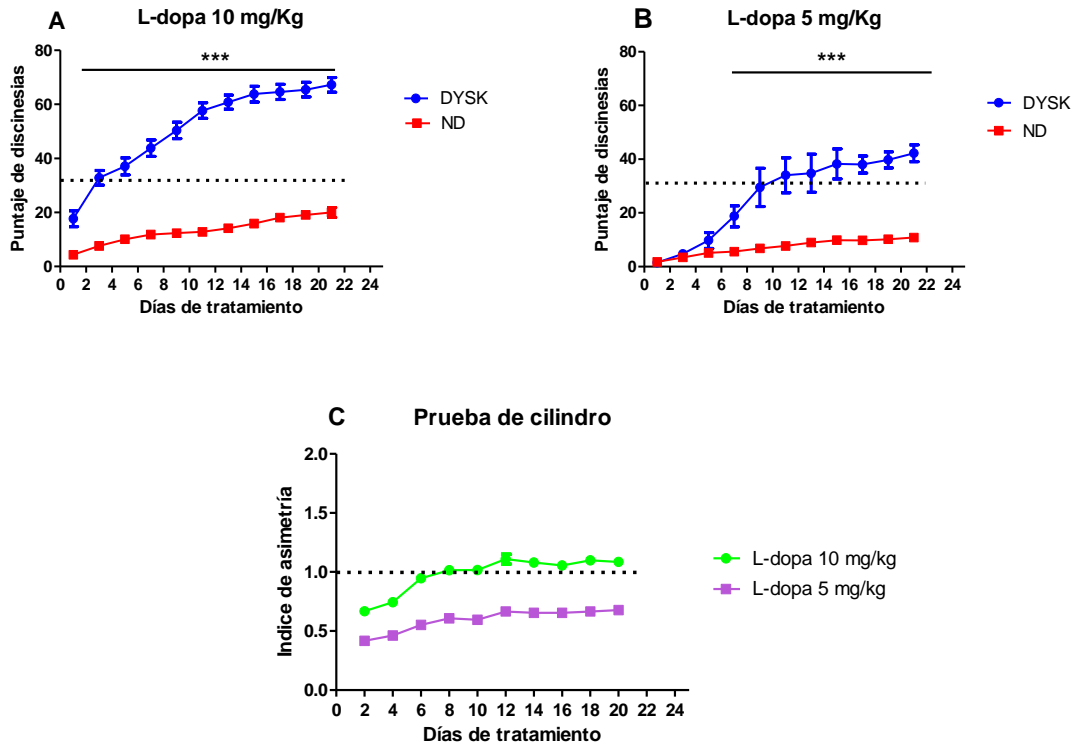
**Figura 9.** Efecto de los agonistas y antagonistas de los receptores GABA-B sobre la liberación de  $[^3\text{H}]\text{GABA}$  y su interacción con los receptores D1 en la sustancia nigra pars reticulata de ratas con denervación dopaminérgica. **A** y **C** muestran el curso temporal de las respuestas. La flecha vertical indica el tiempo cuando se inicia la perfusión de los fármacos, la línea horizontal indica el inicio de la perfusión con la solución de 20 mM de K<sup>+</sup>. En **C** y **D** se resume la magnitud

*de los efectos. Todos los valores están expresados como promedio  $\pm$  error estándar. ns: no hay diferencia significativa. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs control.  $n=3$ . Todos los valores están expresados como promedio  $\pm$  error estándar. ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey. Tres experimentos idénticos fueron realizados y los resultados fueron agrupados. Cada experimento se realizó en rebanadas de 4 ratas con denervación dopaminérgica.*

## 7.2 TRATAMIENTO CON L-DOPA Y FÁRMACOS CON ACCIÓN SOBRE RECEPTORES GABA-B

### 7.2.1 TRATAMIENTO CON L-DOPA

A manera de control, se realizó un tratamiento de L-dopa a la dosis terapéutica (10 mg/Kg) y otro administrando la dosis subterapéutica de 5 mg/Kg. En ambos tratamientos se evaluaron las discinesias (*figura 10A y 10B*) y el efecto terapéutico mediante la prueba de cilindro (*figura 10C*). Como se puede ver en la *figura 10A*, al tratar con 10 mg/kg de L-dopa se obtiene el 50% de animales discinéticos, los cuales alcanzan puntajes mayores a 60 al final del tratamiento, en cambio al administrar la dosis de 5 mg/kg de L-dopa (*figura 10B*), se obtuvieron menos del 20% de animales discinéticos y sus puntaje máximos fueron de 40 aproximadamente. De forma notable se observa que únicamente con la dosis de 10 mg/kg se alcanza el efecto terapéutico adecuado (índice de asimetría=1), lo que no sucede al administrar 5 mg/kg de L-dopa (*figura 10C*).

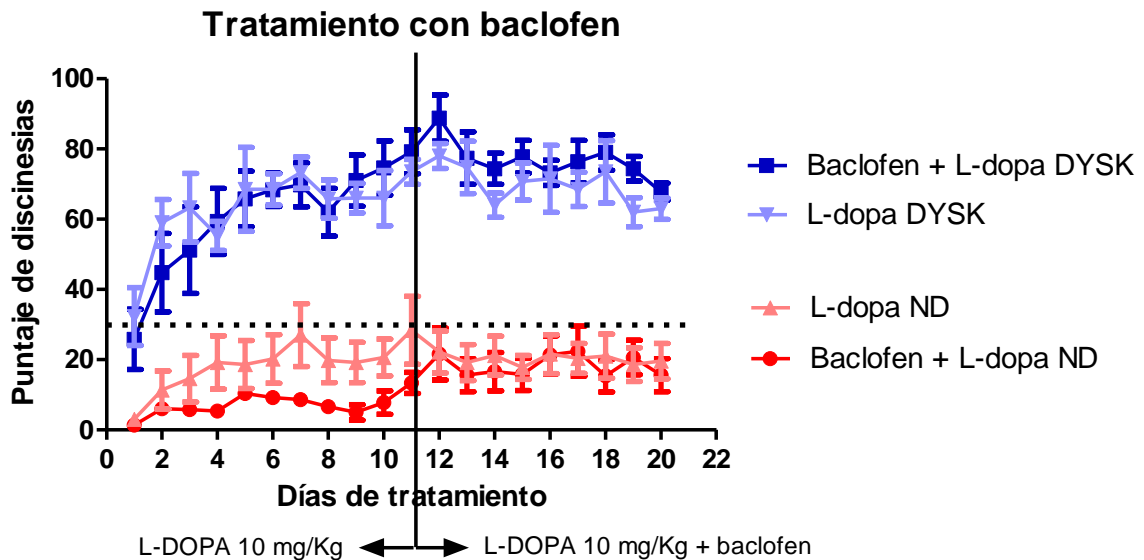


**Figura 10.** **A.** Curso temporal del promedio de las discinesias registradas durante los 21 días de tratamiento con L-dopa (10 mg/Kg)  $n=11$  DYSK,  $n=11$  ND. **B.** Curso temporal del promedio de las discinesias registradas durante los 21 días de tratamiento con L-dopa (5 mg/Kg)  $n=4$  DYSK,  $n=18$  ND. **C.** Prueba de cilindro realizado a todos los animales tratados y previamente lesionados con 6-OHDA.  $***p<0.001$  DYSK vs ND.  $n=22$  en cada grupo. ANOVA de dos vías seguida del test de Bonferroni. Todos los valores están expresados como promedio  $\pm$  error estándar. La línea punteada en **A** y **B** señala el puntaje de discinesias con el cual se separan los animales en discinéticos y no discinéticos el cual es igual a 31. En **C**, la línea punteada señala el índice de asimetría igual a 1.

## 7.2.2 TRATAMIENTO CON L-DOPA Y EL AGONISTA DE RECEPTORES GABA-B, BACLOFEN.

En un grupo de ratas previamente lesionadas, se inició el tratamiento con L-dopa a una dosis de 10 mg/Kg la cual se administró durante los primeros 10 días de tratamiento, a partir del día 11 y hasta el día 21 se co-administró L-dopa con baclofen a una dosis de 4 mg/Kg, dicho fármaco es un agonista de los receptores

GABA-B. Los resultados del tratamiento se muestra en la *figura 11*, donde se puede observar que a pesar de administrar el agonista, el puntaje de las discinesias registradas se mantiene por arriba de los 31 puntos, es decir, los animales que presentan discinesias al administrar la L-dopa siguen presentándolas al administrar baclofen. Esto puede ser debido a que probablemente ya estaban muy activos los receptores y la liberación de GABA era exacerbada.



**Figura 11.** Curso temporal del promedio de las discinesias registradas durante los 21 días de tratamiento. Del día 1 al 10 se administró únicamente L-dopa (10 mg/Kg). A partir del día 11 y hasta el 21, se co-administró L-dopa (10 mg/Kg) y baclofen (4 mg/Kg) en ratas previamente lesionadas con 6-OHDA. n=5 en cada grupo. ANOVA de dos vías seguida del test de Bonferroni. Todos los valores están expresados como promedio  $\pm$  error estándar. La línea punteada señala el puntaje de discinesias con el cual se separan los animales en discinéticos y no discinéticos el cual es igual a 31. (ND: ratas no discinéticas, DYSK: ratas discinéticas).

### 7.2.3 TRATAMIENTO CON L-DOPA Y EL ANTAGONISTA DE RECEPTORES GABA-B, CGP54626

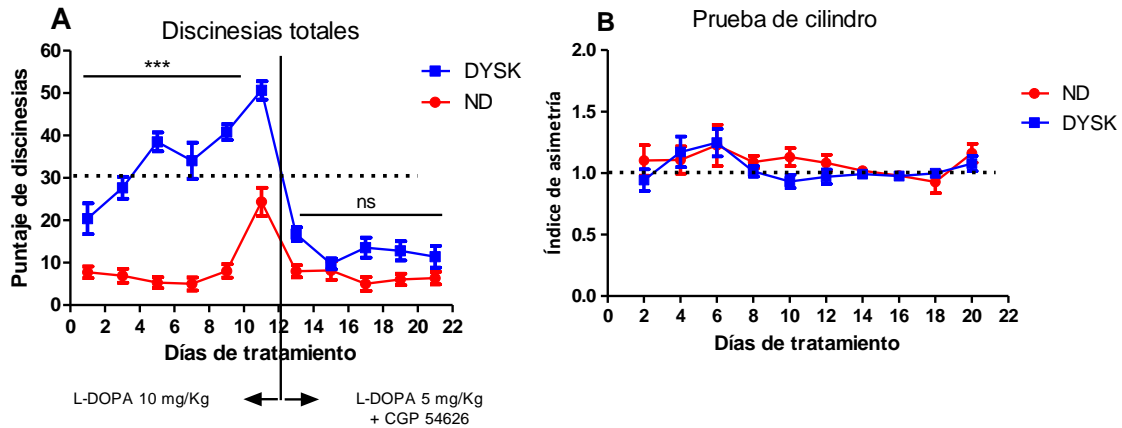
Ya que la administración de la dosis completa de L-dopa junto con la administración del agonista de los receptores GABA-B no resultó útil para disminuir el puntaje de



discinesias en los animales tratados, y con base en los experimentos de liberación realizados (*figuras 8 y 9*) donde se observó que el bloqueo de los receptores GABA-B potencia el efecto de la activación de los receptores D1, decidimos administrar un antagonista de receptores GABA-B (CGP 54626) junto con L-dopa con el fin de evaluar el efecto discinético y terapéutico en este modelo experimental. Para evaluar el efecto del antagonista CGP 54626 en las discinesias inducidas por L-dopa, realizamos un experimento conductual en donde se trataron animales hemiparkinsonicos con L-dopa metil-éster a una dosis de 10 mg/Kg de peso durante los primeros 10 días de tratamiento, ésta dosis es conocida por presentar un efecto terapéutico, pero generar discinesia en aproximadamente un 50% de los animales tratados (Rangel et al 2011). A los 11 días de tratamiento una vez que los animales fueron clasificados como discinéticos o no discinéticos, se decidió disminuir la dosis de L-dopa a 5mg/Kg y administrar el antagonista de los receptores GABA-B, CGP 54626 a una dosis de 0.1mg/Kg de peso (*figura 12*).

En la *figura 12A* se muestran los resultados al evaluar las conductas discinéticas y se graficaron las discinesias totales. Además se evaluó el efecto terapéutico mediante la prueba de cilindro, la cual fue evaluada los días pares del tratamiento y cuyos resultados se muestran en la *figura 12B*. Se puede observar que al disminuir la dosis de L-dopa y bloquear los receptores GABA-B se disminuyen los puntajes de discinesia en animales que ya habían presentado discinesias severas, y lo más importante, se mantiene el efecto terapéutico.

## Tratamiento CGP 54626 + L-DOPA



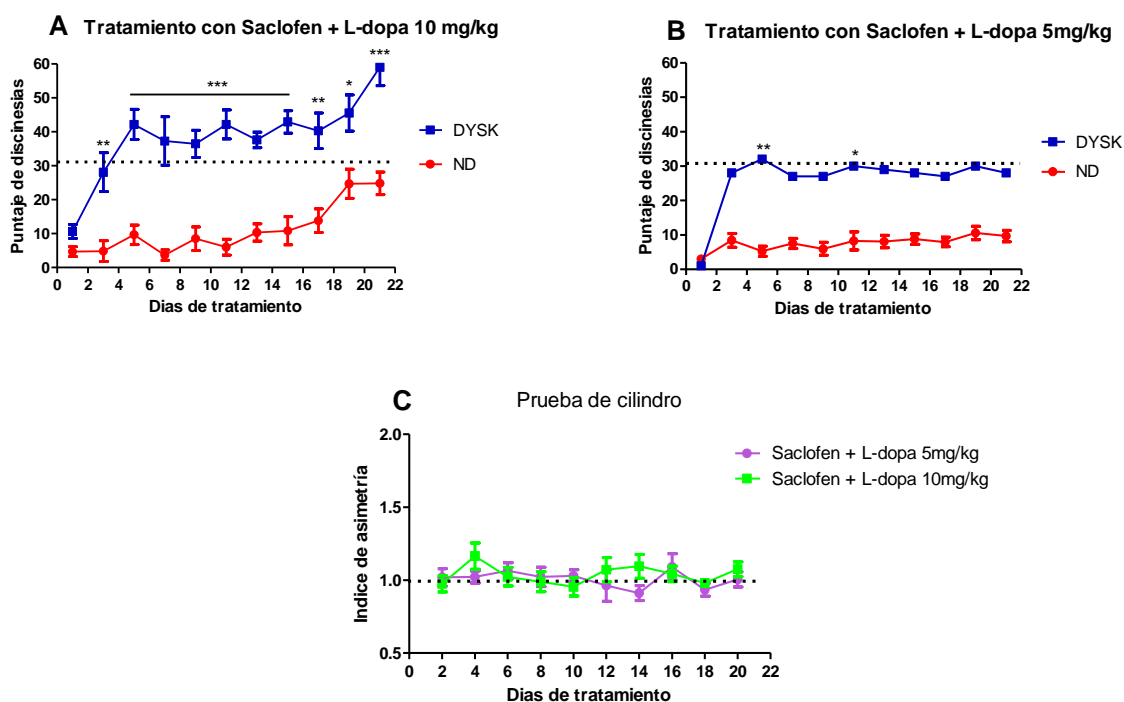
**Figura 12. A** Curso temporal del promedio de las discinesias registradas durante los 21 días de tratamiento. Del día 1 al 10 se administró L-dopa (10 mg/Kg). A partir del día 12 y hasta el 21, se co-administró L-dopa (5 mg/Kg) y CGP 54626 (0.1 mg/Kg) en ratas previamente lesionadas con 6-OHDA. **B.** Prueba de cilindro realizado a todos los animales tratados y previamente lesionadas con 6-OHDA. ns: no hay diferencia significativa. \*\*\* $p < 0.001$  DYSK vs ND.  $n = 13$  ratas ND,  $n = 12$  DYSK tanto en A como en B. ANOVA de dos vías seguida del test de Bonferroni. Todos los valores están expresados como promedio  $\pm$  error estándar. La línea punteada en A señala el puntaje de discinesias con el cual se separan los animales en discinéticos y no discinéticos el cual es igual a 31. En B, la línea punteada señala el índice de asimetría igual a 1. (ND: ratas no discinéticas, DYSK: ratas discinéticas).

### 7.2.4 TRATAMIENTO CON L-DOPA Y EL ANTAGONISTA DE RECEPTORES GABA-B, SACLOFEN.

Dado que la estrategia de administrar un dosis subterapéutica de L-dopa más el antagonista de los receptores GABA-B resultó benéfica en cuanto a que logró disminuir las discinesias y mantener el efecto terapéutico de la L-dopa, realizamos un experimento conductual en donde se trataron animales hemiparkinsonicos con un antagonista de receptores GABA-B (saclofen) junto con L-dopa metil-éster a una dosis de 10 mg/Kg de peso desde el día 1 del tratamiento con el fin de evaluar el efecto discinético y terapéutico en este modelo experimental (figura 13). Para ello separamos los animales en dos grupos, a uno de ellos se coadministró saclofen (0.1 mg/Kg) y L-dopa (10 mg/Kg) y al realizar la evaluación de las discinesias, se obtuvo que de las 17 ratas tratadas, 6 resultaron no discinéticas y 11 discinéticas

(figura 13A). Por otro lado, en el otro grupo de ratas tratadas se administró la dosis subterapéutica de 5 mg/Kg, se obtuvieron 16 ratas no discinéticas y sólo 1 rata discinética (figura 13B). Además se evaluó el efecto terapéutico de los dos grupos de ratas tratadas mediante la prueba de cilindro. Los resultados se muestran en la figura 13C, donde se observa que el índice de asimetría es cercano a 1 para ambos tratamientos, es decir, el efecto terapéutico del tratamiento es el adecuado

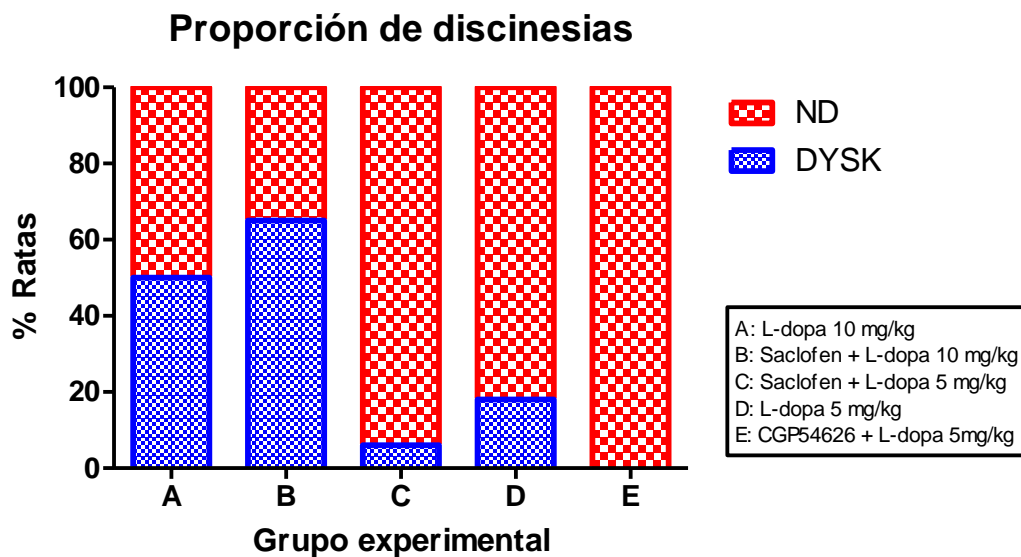
### Tratamiento con saclofen



**Figura 13. A y B.** Curso temporal del promedio de las discinesias registradas durante los 21 días de tratamiento. **A.** Se co-administró saclofen (0.1 mg/Kg) y L-dopa (10 mg/Kg) en ratas previamente lesionadas con 6-OHDA. **B.** Se co-administró saclofen (0.1 mg/Kg) y L-dopa (5 mg/Kg) en ratas previamente lesionadas con 6-OHDA **C.** Prueba de cilindro de ambos grupos de ratas. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  DYSK vs ND.  $n = 6$  ND,  $n = 11$  DYSK en A;  $n = 16$  ND,  $n = 1$  DYSK en B;  $n = 17$  en ambos grupos en C. ANOVA de dos vías seguida del test de Bonferroni. Todos los valores están expresados como promedio  $\pm$  error estándar. La línea punteada en **A** y **B** señala el puntaje de discinesias con el cual se separan los animales en discinéticos y no discinéticos el cual es igual a 31. En **C**, la línea punteada señala el índice de asimetría igual a 1. (ND: ratas no discinéticas, DYSK: ratas discinéticas).

### 7.1.5 EFECTO DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON L-DOPA Y LOS ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR GABA-B SOBRE LA INCIDENCIA DE DISCINESIAS

Para evaluar la incidencia de aparición de discinesias graves, al separar los animales mediante las puntuaciones de discinesias establecidas en el trabajo de Rangel del 2011, encontramos que: el grupo tratado con 10 mg/Kg de L-dopa (dosis conocida como terapéutica) presentó un 50% de población discinética; por su parte el grupo tratado con saclofen 0.1 mg/Kg + L-dopa 10 mg/Kg obtuvo un 65%. El grupo de L-dopa 5 mg/Kg mostró un 18% de animales con discinesias severas, mientras que la misma dosis de L-dopa en combinación con saclofen 0.1 mg/Kg produjo un 6% de animales discinéticos. De manera contundente el tratamiento de CGP 54626 + L-dopa 5mg/Kg no genera animales discinéticos al administrar este antagonista, lo cual es similar al tratamiento de saclofen + L-dopa 5 mg/Kg, ya que ambos son antagonistas de los receptores GABA-B (*figura 14*).



**Figura 14.** Proporción de discinesias expresadas en porcentaje de ratas discinéticas y no discinéticas de los diferentes grupos tratados y previamente lesionados con 6-OHDA. (ND: no discinéticas, DYSK: discinéticas).

## 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La evaluación de la interacción de los receptores D1/GABA-B sobre la liberación de [<sup>3</sup>H]GABA en ratas lesionadas (*figuras 8 y 9* indica que el bloqueo del receptor GABA-B mediante la acción del fármaco CGP 35348 potencia la facilitación de la liberación del neurotransmisor provocada por receptores D1. Esto sugiere que al aumentar la liberación de GABA por el SKF 38393 se libera suficiente neurotransmisor como para activar los receptores GABA-B. Si en las discinesias inducidas por L-dopa la actividad de los receptores D1 se encuentra muy incrementada, entonces es posible que los receptores GABA-B estén sobre activados por el GABA endógeno liberado en exceso. Por ello resulta importante evaluar esta interacción bajo tal condición con el fin de determinar si el uso de antagonistas o agonistas para receptores GABA-B permiten reducir las discinesias inducidas por L-dopa.

Un aspecto importante de la discinesia inducida por L-dopa es que ésta depende de la cantidad de dopamina generada a partir de la L-dopa administrada en el tratamiento, los pacientes que reciben menos dosis de éste fármaco, desarrollan menos discinesia. Sin embargo existe un compromiso entre el efecto terapéutico que solo se obtiene a ciertas dosis y la discinesia que se produce. Dado que la concentración de GABA en la SNr es determinante en el control motor y el efecto terapéutico de la L-dopa, que incrementa sus niveles cuando es administrada en los modelos experimentales, es posible entonces diseñar experimentos donde ya sea que se active a los receptores GABA-B con la dosis terapéutica de L-dopa, o donde se disminuya la dosis de L-dopa para evitar la génesis de discinesia y bloquear los receptores GABA-B, con el fin de aumentar la concentración de GABA.

Por ello diseñamos un experimento en animales hemiparkinsonicos tratados con L-dopa a dosis terapéutica con la idea de que desarrollaran discinesia y a los 11 días de tratamiento se comenzó a administrar un agonista de los receptores GABA-B (baclofen) con el fin de activar a tales receptores y tratar de disminuir de esta manera la liberación de GABA y controlar las discinesias, sin embargo como puede verse en la *figura 11* no se logró el efecto deseado ya que las discinesias alcanzadas por

los animales catalogados previamente como discinéticos no disminuyeron sino que se mantuvieron por arriba de los 31 puntos. Dados estos resultados podemos sugerir que la activación de los receptores D1 con L-dopa cuya vía de señalización se encuentra supersensibilizada en la denervación dopaminérgica, aunada a la activación de los receptores GABA-B contribuye a la facilitación de la liberación de GABA en la sustancia nigra y por lo tanto a la generación de discinesias.

Otra estrategia experimental consistió en que 15 días posteriores a la lesión dopaminérgica con 6-OHDA en el haz del cerebro medio de ratas, se comenzó el tratamiento con L-dopa (10 mg/Kg) durante 11 días y se separaron los animales en discinéticos y no discinéticos, al día 12 se comenzó a administrar el antagonista de los receptores GABA-B denominado CGP 54626 y encontramos que a partir de éste día la disminución de discinesias es notable, se pierde la diferencia significativa de los puntajes de discinesias de los animales previamente clasificados como discinéticos con respecto con los no discinéticos, lo cual claramente sugiere que ésta estrategia es indicada para lograr disminuir las discinesias inducidas por L-dopa ya que además se mantiene el efecto terapéutico de la L-dopa de forma adecuada (*figura 12*). Además este resultado indica que si se aplica este tratamiento en pacientes que ya han desarrollado discinesias inducidas por la L-dopa, probablemente se podría revertir este efecto colateral y lograr un control motor, sin embargo, lo anterior debe ser evaluado mediante otros procedimientos experimentales o clínicos diferentes a los utilizados en esta tesis.

Dado que al administrar el antagonista de los receptores GABA-B más la dosis de L-dopa de 5 mg/Kg se logró disminuir el efecto discinético y el efecto terapéutico de la L-dopa se mantiene en un nivel adecuado, realizamos un experimento donde administramos un antagonista de receptores GABA-B (saclofen) junto con L-dopa desde el inicio del tratamiento (*figura 13*). Para ello, a un grupo de animales se les administró saclofen más L-dopa a la dosis terapéutica de 10 mg/Kg y en otro grupo se administró saclofen más la dosis subterapéutica de L-dopa (5 mg/Kg), y se les evaluaron las conductas discinéticas y el índice terapéutico obteniendo que a pesar de que ambas estrategias resultaron con un efecto terapéutico adecuado, medido

con la prueba de cilindro como puede verse en el *figura 13C*, la administración del antagonista de receptores GABA-B con la dosis subterapéutica de L-dopa resulta prometedora ya que sólo uno de los 17 animales tratados muestra puntajes altos de discinesia. Esto sugiere el potencial uso de los antagonistas de receptores GABA-B con dosis subterapéuticas de L-dopa en el manejo de la discinesia y también sugiere que durante la administración de L-dopa el GABA liberado de las terminales estriado-nigrales por la activación de receptores D1 estimula los receptores GABA-B.

En la *figura 14* vemos que tanto en el tratamiento en el que se administró únicamente L-dopa 10 mg/Kg, como en el que se administró ésta misma dosis junto con el antagonista de los receptores GABA-B, se registró al menos un 50% de animales discinéticos como se menciona en el trabajo de Rangel del 2011, (L-dopa 10mg/Kg: 50%; saclofen + L-dopa 10 mg/Kg: 65%) mientras que en los tratamientos donde se administró L-dopa a la dosis subterapéutica (5mg/Kg) se obtienen porcentajes de animales discinéticos bajos (L-dopa 5mg/Kg: 18%; saclofen + L-dopa 5 mg/Kg: 6%; CGP 54626 + L-dopa 5 mg/Kg: 0%) lo cual es favorable para los pacientes con enfermedad de Parkinson, sin embargo recordando que el efecto terapéutico de la L-dopa solo se mantiene a esta dosis si se administra junto con el antagonista de los receptores GABA-B y se pierde cuando se administra de forma única, podemos decir que ésta puede ser la estrategia más indicada para tratar a los pacientes que padecen la enfermedad de Parkinson, sin embargo cabe destacar que éstos resultados fueron realizados en animales de forma preclínica y que se requieren los estudios clínicos posteriores para poder a los pacientes este tratamiento, sin embargo estos resultados constituyen un indicativo de la estrategia que se puede seguir para un mejor tratamiento de la enfermedad y con esto, incidir en el mejoramiento de la calidad de vida de los pacientes.

## **9. CONCLUSIONES**

El GABA liberado por la activación de receptores D1 en las terminales estriado-nigrales durante la denervación dopaminérgica, activa receptores GABA-B presinápticos.

El tratamiento de una dosis sub-terapéutica de L-dopa y los antagonistas de receptores GABA-B permite disminuir las discinesias inducidas por L-dopa en el Parkinson experimental.

## **10. PERSPECTIVAS**

Llevar a cabo los estudios de la interacción de los receptores D1/GABA-B sobre la liberación de [<sup>3</sup>H]GABA en la sustancia nigra pars reticulata de ratas con denervación dopaminérgica y tratadas con L-dopa divididas en discinéticas y no discinéticas.

Es posible que el tratamiento de una dosis sub-terapéutica de L-dopa y los antagonistas de receptores GABA-B permita a nivel clínico controlar la discinesias inducidas por L-dopa.



## 11. BIBLIOGRAFÍA

Aceves, J., Floran, B., Martinez Fong, D., Sierra, A., Hernandez, S., Mariscal, S., 1991. *L-dopa stimulates the release of [3H]g-aminobutyric acid in the basal ganglio of 6-hydroxydopamine lesioned rats*. Neuroscience Letters. 121, 223-226.

Aceves, J., Floran, B., Sierra, A., Mariscal, S., 1995. *D1 receptor mediated modulation of the release of gamma-amino butyric acid by endogenous dopamine in the basal ganglia of the rat*. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry 19, 727-739.

Bettler, B., Kaupmann, K., Mosbacher, J., Gassmann, M., 2004. *Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors*. Physiol. Rev. 84, 835-867.

Bezard E, Brotchie JM, Gross CE. 2001. *Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesia: potential for new therapies*. Nature Reviews Neuroscience. 2:577-88.

Bischoff, S., Leonhard, S., Reymann, N., Schuler, V., Shigemoto, R., Kaupmann, K., Bettler, B., 1999. *Spatial distribution of GABA(B)R1 receptor mRNA and binding sites in doparot brain*. J. Comp. Neurol. 412, 1e16.

Blandini F, et al. 2000. *Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease*. Prog Neurobiol.; 62:63–88.

Bowery, N.G., Parry, K., Goodrich, G., Ilinsky, I., Kultas-Ilinsky, K., 1999. *Distribution of GABA (B) binding sites in the thalamus and basal ganglia of the rhesus monkey (Macaca mulatta)*. Neuropharmacology 38, 1675-1682.

Breger Ludivine S., Dunnett Stephen B., Lane Emma L. 2013. *Comparison of rating scales used to evaluate L-DOPA-induced dyskinesia in the 6-OHDA lesioned rat*. Neurobiology of Disease 50 142–150

Chaudhuri KR, et al. 2006. *Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management*. Lancet Neurol.; 5:235–45.

Chebib M., Johnston GAR. 1999. *The 'ABC' of gaba receptors: a brief review.* Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 26, 937–940

Chio C. L., Hess G. F., Graham R. S. and Huff R. M. 1990. *A second molecular form of D2 dopamine receptor in rat and bovine caudate nucleus.* Nature 343: 266-269.

Choi EJ, Xia Z, Villacres EC, Storm DR. The regulatory diversity of the mammalian adenylyl cyclases. *Curr Opin Cell Biol* 1993;5:269–73.

Cortes Romero C., Galindo F., Galicia Isasmendi, Flores A. 2011. *GABA: ¿dualidad funcional? Transición durante el neurodesarrollo.* Reviews Neurology; 52 (11): 665-675.

Cryan, J.F., Slattery, D.A., 2010. *GABAB receptors and depression.* Current status. *Adv. Pharmacol.* 58, 427e451.

Dal Toso R., Sommer B., Ewart M., Herb A., Pritchett D. B., Bach A., Shivers B. D. and Seeburg P. H. 1989. *The dopamine receptor: two molecular forms generated by alternative splicing.* EMBO J. 8: 4025-4034.

Dearry A., Gingrich J. A., Falardeau P., Fremeau R. T., Bates M. D. and Caron M. G. 1990. *Molecular cloning and expression of the gene for a human D1 dopamine receptor.* Nature 347: 72-76.

Dickerson JW, Conn PJ. 2012. *Therapeutic potential of targeting metabotropic glutamate receptors for Parkinson's disease.* *Neurodegener Dis Manag.*; 2:221–232.

Doppler W. 1994. *Regulation of gene expression by prolactin.* *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 124:93–130.

Farrer JM 2006. *Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects.* *Nat Rev Genet* 7:306–318.

Feldman RS, Meyer JS, Quenzer LF. 1997. *Catecholamines, Principles of neuropsychopharmacology*. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc. 277–344.

Filip, M., Frankowska, M., 2007. *Effects of GABA(B) receptor agents on cocaine priming, discrete contextual cue and food induced relapses*. Eur. J. Pharmacol. 571, 166-173.

Filip, M., Frankowska, M., 2008. *GABA(B) receptors in drug addiction*. Pharmacol. Rep. 60, 755-770.

Fiorentini C, Busi C, Spano P, and Missale C. 2010. *Dimerization of dopamine D1 and D3 receptors in the regulation of striatal function*. Current Opinion Pharmacology 10:87–92.

Fishburn C. S., Belleli D., David C., Carmon S. and Fuchs S. 1993. *A novel short isoform of the D3 dopamine receptor generated by alternative splicing in the third cytoplasmic loop*. J. Bioi. Chem. 268: 5872-5878.

Florán-Garduño Benjamín, Rangel-Barajas Claudia. 2005. *Activación de receptores dopaminérgicos por L-DOPA. De la acción terapéutica a las discinesias*. Rev Biomed; 16:273-280.

Froestl, W., 2010. *Chemistry and pharmacology of GABAB receptor ligands*. Adv. Pharmacol. 58, 19-62.

Gash DM, Zhang Z, Ovadia A, Cass WA, Yi A, Simmerman L, Russell D, Martin D, Lapchak PA, Collins F, Hoffer BJ, Gerhardt GA. 1996. *Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF*. Nature 380:252–255.

Gasmi M, Brandon EP, Herzog CD, Wilson A, Bishop KM, Hofer EK, Cunningham JJ, Printz MA, Kordower JH, Bartus RT. 2007. *AAV2-mediated delivery of human neurturin to the rat nigrostriatal system: long-term efficacy and tolerability of CERE-120 for Parkinson's disease*. Neurobiol Dis 27(1):67–76.

Gerfen CR. 1992. *The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia*. *Annu Rev Neurosci*;15:285– 320.

Gerfen, C. R., 2003. *D1 dopamine receptor supersensitivity in the dopamine depleted striatum animal model of Parkinson's disease*. *Neuroscientist* 9, 455-462.

Gingrich JA, Caron MG. 1993. *Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors*. *Annu Rev Neurosci*. 16:299–321.

Giros B., Martres M. P., Pilon C., Sokoloff P. and Schwartz J. C. 1991. *Shorter variants of the D3 dopamine receptor produced through various patterns of alternative splicing*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 176: 1584-1592.

Giros B., Sokoloff P., Martres M.P., Riou J. F., Emorine L. J. and Schwartz J. C. 1989. *Alternative splicing directs the expression of two D2 dopamine receptor isoforms*. *Nature* 342: 923-926.

Grandy D. K., Zhang Y., Bouvier C., Zhou Q. Y., Johnson R. A., Allen L., Buck K., Bunzow J. R., Salon J. and Civelli O. 1991. *Multiple human D5 dopamine receptor genes: a functional receptor and two pseudogenes*. *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 9175-9179.

Greenamyre JT, O'Brien CF., 1991. *N-methyl-D-aspartate antagonists in the treatment of Parkinson's disease*. *Arch Neurol.*; 48:977–81.

Hirsch EC, et al. 2000. *Metabolic effects of nigrostriatal denervation in basal ganglia*. *Trends Neuroscience*. 23:S78–85.

Hoffer BJ, Hoffman A, Bowenkamp K, Huettl P, Hudson J, Martin D, Lin LF, Gerhardt GA. 1994. *Glial cell line-derived neurotrophic factor reverses toxin-induced injury to midbrain dopaminergic neurons in vivo*. *Neurosci Lett* 182:107–111.

Hofmann F, Biel M, Flockerzi V. 1994. *Molecular basis for Ca<sub>v</sub>2.1 channel diversity*. *Annu Rev Neurosci*;17:399–418.

Horger BA, Nishimura MC, Armanini MP, Wang LC, Poulsen KT, Rosenblad C, Kirik D, Moffat B, Simmons L, Johnson Jr E, Milbrandt J, Rosenthal A, Bjorklund A, Vandlen RA, Hynes MA, Phillips HS. 1998. *Neurturin exerts potent actions on survival and function of midbrain dopaminergic neurons*. J Neurosci 18:4929–4937.

Hornykiewicz O. 2002. *L-DOPA: from a biologically inactive amino acid to a successful therapeutic agent*. Amino Acids. 23:65-70.

Jankovic J. 2008. *Parkinson's disease: clinical features and diagnosis*. J Neurol Neurosurg Psychiatry.; 79:368–76.

Johnson KA, et al. 2009. *Glutamate receptors as therapeutic targets for Parkinson's disease*. CNS Neurol Disord Drug Targets.; 8:475–91.

Katz, J., Nielsen, K. M., Soghomonian, J. J., 2005. *Comparative effects of acute or chronic administration of levodopa to 6-hydroxydopamine-lesioned rats on the expression of glutamic acid decarboxylase in the neostriatum and GABA A receptors subunits in the substantia nigra, pars reticulata*. Neuroscience 132, 833–842.

Kaupmann, K., Huggel, K., Heid, J., Flor, P.J., Bischoff, S., Mickel, S.J., McMaster, G., Angst, C., Bittiger, H., Froestl, W., Bettler, B., 1997. *Expression cloning of GABA(B) receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors*. Nature 386, 239-246.

Kearns CM, Gash DM. 1995. *GDNF protects nigral dopamine neurons against 6-hydroxydopamine in vivo*. Brain Res 672:104–111.

Kirik D, Georgievska B, Bjorklund A. 2004. *Localized striatal delivery of GDNF as a treatment for Parkinson disease*. Nat Neurosci 7(2):105–110.

Koob GF, Bloom FE. 1988. *Cellular and molecular mechanisms of drug dependence*. Science. 242:715–23.

Koob GF. 1992. *Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways*. Trends Pharmacol Sci 13:177–84.

Kulik, A., Vida, I., Fukazawa, Y., Guetg, N., Kasugai, Y., Marker, C.L., Rigato, F., Bettler, B., Wickman, K., Frotscher, M., Shigemoto, R., 2006. *Compartmentdependent colocalization of Kir3.2-containing Kp channels and GABAB receptors in hippocampal pyramidal cells*. J. Neurosci. 26, 4289-4297.

Kulik, A., Vida, I., Luj\_an, R., Haas, C.A., L\_opez-Bendito, G., Shigemoto, R., Frotscher, M., 2003. *Subcellular localization of metabotropic GABA(B) receptor subunits GABA(B1a/b) and GABA(B2) in the rat hippocampus*. J. Neurosci. 23, 11026-11035.

Lacey, C. J., Boyes, J., Gerlach, O., Chen, L., Magill, P. J., Bolam, J. P., 2005. *GABA(B) receptors at glutamatergic synapses in the rat striatum*. Neuroscience 136, 1083-1095.

Lang AE, Lozano AM. 1998. *Parkinson's disease. Second of two parts*. N Engl J Med 339:1130–43.

Le Moal M, Simon H. 1991. *Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles*. Physiol Rev. 71:155–234.

Lefkowitz R. J. and Caron M. G. 1988. *The adrenergic receptors: models for the study of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins*. J. Bioi. Chern. 263: 4993-4996.

Lindholm P, Voutilainen MH, Lauren J, Peranen J, Leppa"nen VM, Andressoo JO, Lindahl M, Janhunen S, Kalkkinen N, Timmusk T, Tuominen RK, Saarma M. 2007. *Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain dopamine neurons in vivo*. Nature 448:73–77.

Lopez-Bendito, G., Shigemoto, R., Kulik, A., Vida, I., Fair\_en, A., Luj\_an, R., 2004. *Distribution of metabotropic GABA receptor subunits GABAB1a/b and GABAB2 in*

*the rat hippocampus during prenatal and postnatal development.* Hippocampus 14, 836-848.

Lujan, R., Shigemoto, R., 2006. *Localization of metabotropic GABA receptor subunits GABAB1 and GABAB2 relative to synaptic sites in the rat developing cerebellum.* Eur. J. Neurosci. 23, 1479-1490.

Misgeld, U., 2004. *Innervation of the substantia nigra.* Cell Tissue Res. 318, 107-114.

Missale C., Russel Nash S., Robinson, Jaber M., Caron Marc G. 1998. *Dopamine receptors: From structure to function.* Physiological reviews published. 78:1,189-225.

Monsma F. J., Mahan L. C., McVittie L. D., Gerfen C. R. and Sibley D. R. 1990. *Molecular cloning and expression of a D1 dopamine receptor linked to adenylyl cyclase activation.* Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A. 87: 6723-6727.

Monsma F. J., McVittie L. D., Gerfen C. R., Mahan L. C. and Sibley D. R. 1989. *Multiple D2 dopamine receptors produced by alternative RNA splicing.* Nature 342: 926- 929.

Nava Asbell C., Paz Bermudez F., Erlij D, Aceves J, Florán B., 2007. *GABA B receptor activation inhibits dopamine D1 receptor-mediated facilitation of [<sup>3</sup>H]GABA release in substantia nigra pars reticulata.* Neuropharmacology. 53, 631-637.

Obeso José A., Rodriguez- Oroz María C, Rodriguez Manue, Ilanciego, José L., Artieda Julio, Gonzalo Nancy and Olanow C. Warren. 2000. *Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease.* V ol. 23, No. 10 (Supl.),

Olanow CW, Stern MB, Sethi K. 2009. *The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson's disease.* Neurology 72:S1–S136.

O'Malley K. L., Harmon S., Tang L. and Todd R. D. 1992. *The rat dopamine D4 receptor: sequence, gene structure, and demonstration of expression in the cardiovascular system.* The New Biologist 4: 137-146

Prashanth LK, et al. 2011. *L-Dopa-induced dyskinesia-clinical presentation, genetics, and treatment*. International review of neurobiology. 98:31–54.

Przedborski S. 2005. *Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease*. Parkinsonism Relat Disord.; 11(Suppl 1):S3–7.

Radnikow, G., Misgeld, U., 1998. *Dopamine D1 receptors facilitate GABA A synaptic currents in the rat substantia nigra pars reticulata*. J. Neurosci. 18, 2009-2016.

Rangel, C., Silva, I., Garcia, M., Sanchez, E., Floran, L., Aceves, J., Erlij, D., Floran, B., 2008. *6-OHDA-induced hemiparkinsonism and chronic L-DOPA treatment increase dopamine D1-stimulated [<sup>3</sup>H]GABA release and [<sup>3</sup>H]-cAMP production in substantia nigra pars reticulata of the rat*. Neuropharmacology 55, 704–711.

Rangel, C.R., Siva, I., Aceves, J., Erlij, D., Floran, B., 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, 51-61.

Rosenblad C, Kirik D, Devaux B, Moffat B, Phillips HS, Bjorklund A. 1999. *Protection and degeneration of nigral dopaminergic neurons by neurturin or GDNF in a partial lesion model of Parkinson's disease after administration into the striatum or the lateral ventricle*. Eur J Neurosci 11:1554–1566.

Savitt JM, Dawson VL, Dawson TM. 2006. *Diagnosis and treatment of Parkinson disease: molecules to medicine*. J Clin Invest 116(7):1744–1754.

Shaikh S., Gill M., Owen M., Asherson P., McGuffin P., Nanko S., Murray R. M. and Collier D. A. 1994. *Failure to find a linkage between a functional polymorphism in the dopamine D4 receptor gene and schizophrenia*. Am. J. Med. Gen. 54: 8-11.



Sokoloff P., Giros B., Martres M. P., Barthenet M. L. and Schwartz J. C. 1990. *Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics*. Nature 347: 146-151.

Sunahara R. K., Niznik H. B., Weiner D. M., Stormann T. M., Brann M. R., Kennedy J. L., Gelernter J. E., Rozmahel R., Yang Y. L., Israel Y., Seeman P. and O'Dowd B. F. 1990. *Human dopamine D1 receptor encoded by an intronless gene on chromosome 5*. Nature 347: 81-83.

Sunahara R. K., Seeman P., VanTol H. H. M. and Niznik H. B. 1991. *Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1*. Nature 350: 614-619.

Tiberi M., Jarvie K. R., Silvia C., Falardeau P., Gingrich J. A., Godinot N., Bertrand L., Yang-Feng T. L., Freneau R. T. and Caron M.G. 1991. *Cloning, molecular characterization, and chromosomal assignment of a gene encoding a second D1 dopamine receptor subtype: differential expression pattern in rat brain compared with the D1a receptor*. Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A. 8-8: 7491-7495.

Timmer M, Cesnulevicius K, Winkler C, Kolb J, Lipokatic-Takacs E, Jungnickel J, Grothe C. 2007. *Fibroblast growth factor (FGF)-2 and FGF receptor 3 are required for the development of the substantia nigra, and FGF-2 plays a crucial role for the rescue of dopaminergic neurons after 6-hydroxydopamine lesion*. J Neurosci 27(3):459–471.

Tomac A, Lindqvist E, Lin LF, Ogren SO, Young D, Hoffer BJ, Olson L. 1995. *Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo*. Nature 373:335–339.

Tronci, E., Fidalgo, C., Zianni, E., Collu, M., Stancampiano, R., Morelli, M., Gardoni, F., Carta, M., 2014. *Effect of memantine on l-dopa-induced dyskinesia in the 6-ohda lesioned rat model of parkinson's disease*. Neuroscience. 265, 245–252.

Vallone D, Picetti R, Borrelli E. 2000. *Structure and function of dopamine receptors*, Neuroscience and Biobehavioral Reviews 24 125–132.

Van Tot H. H. M., Bunzow J. R., Guan H.-C., Sunahara R. K., Seeman P., Niznik H. B. and Civelli O. 1991. *Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine*. Nature 350: 610-614.

Vlachou, S., Markou, A., 2010. *GABAB receptors in reward processes*. Adv. Pharmacol. 58, 315-371.

Voutilainen MH, Ba" ck S, Pera" nen J, Lindholm P, Raasmaja A, Ma" nnisto" PT, Saarma M, Tuominen RK. 2011. *Chronic infusion of CDNF prevents 6-OHDA-induced deficits in a rat model of Parkinson's disease*. Exp Neurol 228(1):99–108.

Voutilainen MH, Back S, Po" rsti E, Toppinen L, Lindgren L, Lindholm P, Pera" nen J, Saarma M, Tuominen RK. 2009. *Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor is neurorestorative in rat model of Parkinson's disease*. J Neurosci 29(30):9651–9659.

Weinshank R. L., Adham N., Macchi M., Olsen M. A., Branchek T. A. and Hartig P. R. 1991. *Molecular cloning and characterization of a high affinity dopamine receptor (D 1 beta) and its pseudogene*. J. Bioi. Chern. 266: 22427-22435.

Wichmann T, DeLong MR. 1996. *Functional and pathophysiological models of the basal ganglia*. Curr Opin Neurobiol.; 6:751–8.

Windels, F., Kiyatkin, E. A., 2006. *Gabaergic mechanism in regulating activity state of substantia nigra pars reticulata neurons*. Neuroscience 140, 1289-1299.

Zhang Y, et al. 2005. *Allosteric potentiators of metabotropic glutamate receptor subtype 5 have differential effects on different signaling pathways in cortical astrocytes*. J Pharmacol Exp Ther.; 315:1212–9.

Zhou Q. Y., Grandy D. K., Thambi L., Kushner J. A., Van Tot H. H. M., Cone R., Pribnow D., Salon J., Bunzow J. R. and Civelli O. 1990. *Cloning and expression of human and rat D1 dopamine receptors*. Nature 347: 76--80.