



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**“Estudio neuroquímico y electrofisiológico de la señalización en la co-  
activación de receptores CB1-D2 en terminales estriatales del Globo  
Pálido”**

TESIS

Que presenta

RENÉ NAHÚM CABALLERO FLORÁN

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE NEUROFARMACOLOGÍA

Director de tesis:

Benjamín Florán Garduño

Ciudad de México

NOVIEMBRE, 2016

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio #4 del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del IPN bajo la dirección del Dr. Benjamín Florán Garduño. Un proyecto financiado por CONACYT y una beca otorgada por esta misma institución para el maestro en ciencias René Nahúm Caballero Florán inscrito al departamento de Farmacología.



## **I. Resumen.**

En el SNC a nivel de los Ganglios Basales, núcleos cerebrales encargados de controlar la actividad motora, se ha reportado que la co-activación de receptores a cannabinoides del tipo 1 normalmente acoplados a proteínas Gi, con otros receptores acoplados a proteínas G ( $\mu$  ó A2a) pueden estimular la liberación de GABA en vez de inhibirla; esto por activación de distintas vías de señalización como lo son la vía de la AC-AMPC-PKA o la vía de la PLC-PKC. Resultados similares se han obtenido al co-estimular receptores CB1 con receptores a dopamina D2/D4 en el Globo Pálido Externo, un efecto que se ha atribuido a un cambio en la vía de señalización o dimerización. Sin embargo en este hallazgo, quedaba pendiente resolver algunos aspectos como: determinar si en la respuesta es con el receptor D2 y no el D4, también aclarar si dicho efecto es solo ejercido por el uso de agonistas farmacológicos, o también si puede ser provocado de manera fisiológica por la liberación de endocannabinoides y finalmente establecer si es posible un cambio de acople de proteínas Gi a Gs que pueda desembocar en la activación de vías de transducción de señales que promuevan la estimulación de la liberación de GABA. Derivado de las preguntas anteriores, en este trabajo aclaramos con técnicas electrofisiológicas y de medición de la formación de AMPC; que la co-activación de receptores CB1-D2 estimula la liberación de GABA en la terminal estriado-palidal, un efecto que se previene por H-89 un inhibidor de la PKA, indicando que el efecto es mediado por la vía AC-AMPC-PKA. También mostramos que el cambio de acople de proteínas Gi a Gs depende de receptores CB1 ya que experimentos en presencia de PTX, un bloqueador de proteínas Gi, la activación de estos receptores estimula la liberación de GABA. También demostramos por primera vez, que el efecto estimulador por co-activación de receptores CB1-D2 sobre la liberación de GABA, es mediado por endocannabinoides, lo cual es de relevancia fisiológica ya que la modulación de la liberación de este neurotransmisor en el Globo Pálido es un paso clave para el control de la actividad motora.

## **II. Abstract.**

In the CNS at the level of the basal ganglia, cerebral nuclei responsible for controlling motor activity, it has been reported that the co-activation of type 1 cannabinoid receptors normally attached to proteins Gi, with other ( $\mu$  or A2a) G protein-coupled receptors can stimulate the release of GABA rather than inhibit it; this for activation of different signaling pathways such as the AC-cAMP-PKA pathway or the PLC-PKC pathway. Similar results have been obtained to co-activate receptors CB1 receptors to dopamine D2/D4 in the External Globus Pallidus, an effect that has been attributed to a change in the way of signaling or dimerization. However, in this finding it was pending to resolve some aspects such as: determine if the response is with D2 and not the D4 receptor, also clarify if this effect is only exercised by the use of pharmacological agonists, or if you can be provoked in a physiological way by the release of endocannabinoids and finally set if possible a change of attach protein Gi to Gs that can lead to the activation of signal transduction of signals that promote stimulation of GABA release. Derivative of the above questions, in this work clarified with electrophysiological techniques and measurement of cAMP formation, that the CB1-D2 co-activacion stimulates the release of GABA in the striato-pallidal terminal, an effect that is prevented by H-89 a PKA blocker, indicating that the effect is mediated via the AC-cAMP-PKA pathway. Also show that the change of coupling of protein Gi to Gs depends on CB1 receptors as shown in experiments in presence of PTX, a blocker of protein Gi, that the activation of these receptors stimulates the release of GABA. We also demonstrate for the first time, that the stimulatory effect by co-activation of CB1-D2 receptors on the release of GABA is mediated by endocannabinoids, which is of physiological significance since the modulation of the liberation of this neurotransmitter in the Globus Pallidus is a key step for the control of motor activity.

I. Resumen	7
II. Abstract	8
1. Índice.	9
2. Abreviaturas	11
3. Introducción.	13
3.1. El sistema endocanabinoide.	13
3.2. Biosíntesis y degradación de la anandamida y 2-AG.	14
3.3. Los cannabinoides y su farmacología	15
3.4. El receptor CB1 y su vía de señalización.	16
3.5. El receptor CB1 en los Ganglios Basales (GB) y la enfermedad de Parkinson.	17
3.6. La interacción del receptor CB1 con otros receptores acoplados a proteínas G.	20
4. Planteamiento del problema.	22
5. Hipótesis.	25
6. Objetivo:	26
6.1. Objetivos específicos.	26
7. Materiales y Métodos.	27
7.1. Animales.	27
7.2. Obtención de rebanadas.	27
7.2.1. Obtención de rebanadas de cerebro de ratón para registro electrofisiológico.	27
7.2.2. Obtención de rebanadas de globo pálido de rata para los experimentos de acumulación de [3H]-AMPC.	28
7.3. Acumulación de [3H]-AMPC.	28
7.4. Registro de las corrientes post-sinápticas inhibitorias evocadas (CPIe) por par de pulsos en globo pálido externo (GPe).	29
7.5. El DSI en registros de corrientes post-sinápticas inhibitorias evocadas.	31
7.6. Registros de corrientes post-sinápticas inhibitorias evocadas en presencia de PTX.	32
8. Resultados.	33
8.1. Estimulación de la liberación de GABA por co-activación de los receptores CB1 y D2.	33
8.1.2. Caracterización electrofisiológica de las neuronas del GPe.	33
8.1.3. El efecto inhibitorio sobre la liberación de GABA producida por el agonista del receptor CB1, ACEA se vuelve estimulador en presencia del agonista del receptor D2, Quinpirole; efecto mediado por la PKA.	34
8.1.4. Los endocannabinoides pueden activar los receptores CB1 e inhibir la liberación de GABA. La activación de receptores D2 también vuelve estimulador el efecto.	40
8.1.5. La activación de receptores CB1 en presencia de PTX incrementa la liberación de GABA en terminales estriado-palidales por un cambio de acople de proteínas Gi a Gs y estimulación de la PKA.	45
8.2. La co-activación de los receptores CB1 y D2 estimula la formación de AMPC en sinaptosomas de GP.	49
9. Discusión.	51
9.1. Estimulación de la liberación de GABA por co-activación CB1-D2.	51
9.2. El efecto en estimulación de la liberación de GABA por co-activación de receptores CB1-D2 es mimetizado por endocannabinoides.	54

9.3. Cambio de Acople del receptor CB1 de proteínas Gi a Gs y activación de la vía AC-AMPC- PKA.	56
9.4. Relevancia fisiológica.	57
10. Conclusiones.	59
11. Referencias.	60

## 2. Abreviaturas

<b>Término</b>	<b>Abreviatura</b>
2-arachinoilglicerol	2-AG
6-cyano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona	CNQX
Ácido glutámico	Glu
Ácido- $\gamma$ -amino-butírico	GABA
Adenilato Cilasa	AC
DL-2-fosfonopentanoico	APV
Receptores acoplados a proteínas G	GPCR's
amidohidrolasa de ácidos grasos	FAAH
Araquidonil-fosfatidil-etanolamina	NArPE
Estriado	Str
Fosfolipasa C	PLC
Ganglios Basales	GB
Globo Pálido Externo	GPe
Globo Pálido Interno	GPi
Jun N-terminal kinasa	JNK
Mono-ácil Glicerol Lipasa	MAGL
N-ácil-fostatidil-etanol-amina-específica de la fosfolipasa D	NAPE-PLD
n-araquidonil-etanolamina	AEA



Neuronas Espinosas Medianas	NEM
Núcleo Subtalámico	NST
Proteínas cinasas activadas por mitógeno	MAPK's
Sistema nervioso central	SNC
Sistema nervioso periférico	SNP
Sustancia Nigra Pars Compacta	SNC
Sustancia Nigra Pars Reticulada	SNr
Toxina pertussis	PTX
Transportador de endocannabinoides	MET

### **3. Introducción.**

#### **3.1. El sistema endocanabinoide.**

El sistema endocanabinoide se compone de tres elementos: 1) los receptores a canabinoides CB1 y CB2, 2) los agonistas endógenos conocidos como endocanabinoides y 3) las enzimas que se encargan de su biosíntesis y degradación. Los endocanabinoides son los agonistas fisiológicos que presentan alta afinidad por los receptores CB1 y CB2; de estos ligandos los compuestos más estudiados son la n-araquidoniletanolamina, también conocida como anandamida (AEA) y el 2-araquidonilglicerol (2-AG). Estos compuestos debido a que se sintetizan a partir de amidas, ésteres, éteres y derivados del ácido araquidónico tienen una estructura química “eicosanoide” que se caracteriza por una larga cadena de ácidos grasos poli-insaturados. La diversidad en la estructura de estos ligandos facilita la selectividad a los receptores (Di Marzo., et al. 2004, 2011; Howlett., et al. 2002; Piomelli., et al. 2000).

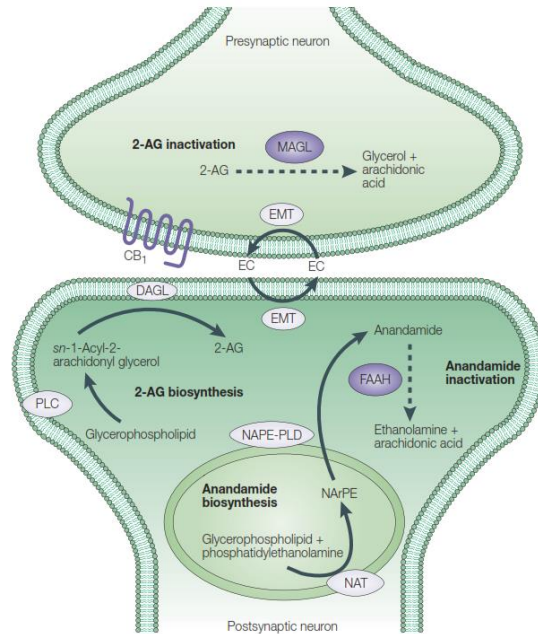
Los receptores CB1 y CB2 se clonaron en 1990 y 1993 respectivamente, presentando una homología en su secuencia de aminoácidos del 48% (Di Marzo., et al. 2004; 2011; Howlett., et al. 2002 Howlett, 2005). Estos son receptores de siete dominios transmembranales (7-TM) acoplados a proteínas G (GPCR's) y se expresan de manera diferencial en el sistema nervioso central (SNC) y en el sistema nervioso periférico (SNP). El receptor CB1 es uno de los GPCRs más abundantes en el SNC, se expresa mayormente en los ganglios basales (GB) y en menor proporción en algunas regiones del SNP. Las funciones del receptor CB1 en el SNC se determinaron de acuerdo a su localización. Por ejemplo: distintos estudios sugieren su participación en respuestas plásticas neuronales como la depresión de la transmisión sináptica a largo y a corto plazo, este fenómeno se observa en los circuitos neuronales de la corteza cerebral y se relaciona con las funciones cognitivas y las emociones. Otros estudios involucran al receptor CB1 con el mecanismo de recompensa durante el consumo de drogas de abuso a nivel meso-límbico. Por otro lado, la abundancia de los receptores CB1 y los endocanabinoides en los GB y el

cerebelo hace de este sistema de comunicación intercelular un importante modulador del movimiento y la coordinación motora (Di Marzo., et al. 2004; Howlett, 2005).

### **3.2. Biosíntesis y degradación de la anandamida y 2-AG.**

Los endocannabinoides como el 2-AG y la AEA son neurotransmisores retrógrados que se sintetizan bajo demanda en respuesta al aumento del calcio intracelular en la célula post-sináptica, se liberan al espacio sináptico donde ejercen sus efectos a partir de la activación de sus receptores que se encuentran a nivel pre-sináptico. Tanto la AEA como el 2-AG se sintetizan a través de la hidrólisis de los lípidos de la membrana. La N-araquidonilfosfatidiletanolamina (NArPE) es el principal precursor de la AEA y el glicerofosfolípido el del 2-AG. Las enzimas encargadas de la biosíntesis de estos compuestos dependen del calcio intracelular y se localizan en la post-sinapsis; respecto a su degradación, el 2-AG se degrada en la célula pre-sináptica, por el contrario la AEA se degrada nivel post-sináptico.

La AEA se sintetiza por acción de la N-aciltransferasa (NAT) a partir de: el glicerofosfolípido más la fosfatidiletanolamina sintetizando inicialmente a la N-araquidonilfosfatidiletanolamina (NArPE). LA NArPE da lugar a la formación de la AEA por acción de la N-acil-fosfatidil-etanol-amina-específica de la fosfolipasa D (NAP-PLD). Una vez sintetizada la AEA se libera al espacio sináptico por el transportador membranal de endocannabinoides (EMT). El EMT también se encarga del reingreso de la AEA a la célula para su posterior inactivación por la amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH). La síntesis del 2-AG se lleva a cabo por tres pasos: el primero es la lisis de los glicerofosfolípidos por la fosfolipasa C (PLC), formando el sn-1-acil-araquidonilglicerol el cual se transforma en 2-AG por acción de la SN-1-diacilglicerol lipasa (DAGL). Una vez sintetizado el 2-AG se libera al espacio sináptico por el EMT y se degrada en la pre-sinapsis por medio de la mono-acil-glicerol-lipasa (MAGL). (Di Marzo., et al. 2004; 2011) Ilustración 1.



**Ilustración 1. Muestra la ruta y las enzimas involucradas en la biosíntesis de 2-AG y AEA. (Tomado de Di Marzo., et al. 2004).**

### 3.3. Los cannabinoides y su farmacología

El término cannabinoide aplica a todas aquellas moléculas que tienen afinidad por los receptores a cannabinoides; los cuales se clasifican de acuerdo a su origen en: 1) endocannabinoides, que se sintetizan fisiológicamente, 2) fitocannabinoides, que son los componentes activos de la planta *Cannabis Sativa* y 3) cannabinoides sintéticos. Los cannabinoides tienen distinta afinidad a los receptores así como diferente acción farmacológica. Respecto a los endocannabinoides, el AEA es más afín por el receptor CB1 que por el receptor CB2, mientras que el 2-AG no tiene preferencia entre los dos receptores. Por otra parte, el endocannabinoide virodamina tiene mayor afinidad por el receptor CB1 que por el CB2, al igual que el noladín éter y la N-araquidonildopamina.

Actualmente la estructura de los cannabinoides endógenos se reproduce de manera sintética para generar nuevas drogas como el ACEA, el ACPA, el O-1812, la Met-fluoro-anandamida y la (R)-Met-anandamida; los últimos tres

presentan mayor afinidad por el receptor CB1 que por el CB2. Dentro de los derivados de las *Cannabis Sativa* se encuentran el (-)- $\Delta^9$ -tetrahidrocanabinol (THC), el dronabinol (marinol) y la nabilona, estos cannabinoides dieron origen a compuestos sintéticos más selectivos como el HU-210 y algunos agonistas poco comunes, denominados bicíclicos como el CP-55940 utilizado como herramienta para dilucidar la localización del receptor CB1 en el SNC. Otros ligandos tricíclicos y tricíclicos no clásicos como el R-(+)-WIN-55,212-2, el JW-015 y el L 768242 tienen diferente afinidad por cada receptor y diferente farmacología.

Dentro de los antagonistas, los cuales presentan más afinidad por el receptor CB1 que los ligandos endógenos tenemos al AM-251, el AM-281 y el SR-141716A (mejor conocido como Rimonabant). Estos ligandos endógenos actúan como agonistas inversos del receptor CB1. (Di Marzo., et al. 2004; Howlett., et al. 2002).

### **3.4. El receptor CB1 y su vía de señalización.**

El receptor CB1 se expresa abundantemente en el cerebro, principalmente en núcleos localizados en los GB, el cerebelo, el hipocampo y la corteza cerebral, es decir en zonas del cerebro que se encargan de la regulación del aprendizaje, la memoria y el control motor. En estos núcleos, el receptor CB1 se considera como un inhibidor de la liberación de neurotransmisores, debido a que se localiza en las terminales pre-sinápticas en donde su activación inhibe a los canales de calcio (Di Marzo., et al. 2004; Piomelli., et al. 2000; Demuth y Molleman 2006). El dominio C-terminal intracelular de este GPCR se asocia a las proteínas G de la familia  $G_{i/o}$  ( $G_i$  1, 2 y 3) que median la transducción de señales durante la estimulación por sus ligandos (Di Marzo., et al. 2004; Demuth y Molleman 2006; Mukhopadhyay., et al. 2002). La activación del receptor CB1 promueve o inhibe distintas vías de señalización. Por ejemplo la inhibición de la adenilato ciclasa (AC) por actividad del receptor CB1, provoca un decremento en la formación del monofosfato de adenosina cíclico (AMPC). La baja disponibilidad de este segundo mensajero intracelular disminuye la

actividad de la proteína cinasa A (PKA), provocando la inhibición de la liberación de neurotransmisores debido a la hiperpolarización de la terminal sináptica, esto debido a la baja fosforilación de los canales iónicos activados por la PKA (Bidaut-Russel., et al. 1990; Glass y Felder 1997). La activación de los receptores CB1 por sus agonistas modula la actividad de distintos canales iónicos, como los canales de  $Ca^{+2}$  del tipo N, L, y P/Q, así como los canales de  $K^{+}$  del tipo Kir (Demuth y Molleman 2006; Howlett., et al. 2002; Howlett, 2005). Otros estudios reportan que los receptores CB1 estimulan las vías de señalización de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs), como p42, p/44, la p38MAPK y la cinasa del N-terminal de Jun (JNK). Estas cinasas regulan factores de transcripción nucleares (Di Marzo., et al. 2004; Howlett., et al. 2002 y 2005). Por otro lado, se propone en sistemas nativos que el receptor CB1 sufre un cambio en el acople de proteínas del subtipo  $G_i$  por proteínas del subtipo  $G_s$ . Este cambio lleva a la activación de distintas vías de señalización que promueven el aumento de la concentración de  $Ca^{+2}$  intracelular debido a la estimulación de las fosfolipasas C y A (Howlett, 2002 y 2005; Glass y Felder 1997; Gonzalez., et al. 2009).

### **3.5. El receptor CB1 en los Ganglios Basales (GB) y la enfermedad de Parkinson.**

Los ganglios basales (GB) son un grupo de núcleos subcorticales que se ubican en la base del cerebro; conformados por: el núcleo estriado (Str), el globo pálido externo (GPe), el globo pálido interno (GPi), el núcleo subtalámico (NST) y la sustancia nigra, pars reticulata (SNr) y pars compacta (SNc) (Rommelfanger y Wichmann 2010). En su organización funcional, estos núcleos forman un circuito denominado circuito de los ganglios basales donde; los núcleos Str y NST sirven como núcleos de entrada, mientras que GPi/SNr operan como núcleos de salida del circuito enviando sus terminales hacia el tálamo. Los núcleos de salida y entrada en el circuito hacen relevo con el GPe dando lugar a la formación de dos vías, conocidas como: vía directa y vía

indirecta. En ambas vías las terminales de tipo GABAérgico y glutamatérgico que interconectan a los distintos núcleos se modulan por la dopamina que proviene de la SNc a través de los receptores a dopamina que se expresan de manera diferencial en ambas vías. La vía directa es una proyección mono-sináptica que va de las neuronas espinosas medianas (NEM) del núcleo estriado hacia los núcleos de salida (SNr/GPi). Las NEM que participan en esta vía son de tipo GABAérgico y promueven la inhibición de los núcleos de salida. Estas expresan principalmente receptores a dopamina de tipo D1, sustancia P y dinorfina. Por su parte, las NEM que provienen del Str que proyectan a la vía indirecta envían sus terminales GABAérgicas al GPe. Estas neuronas expresan a los receptores a dopamina del tipo D2 y a la encefalina. El GPe manda axones al NST, este último utiliza ácido glutámico (Glu) como neurotransmisor. El NST envía axones a los núcleos de salida (GPi/SNr), ejerciendo un efecto excitatorio. Los núcleos de salida disparan de manera tónica y mantienen el control inhibitorio en los núcleos pre-motores del tálamo. Las pausas breves en el comportamiento inhibitorio de los núcleos de salida de los GB facilitan el movimiento, mientras que las descargas neuronales intensas lo inhiben. Las proyecciones dopaminérgicas que provienen de la SNc ejercen sus efectos a través de los receptores a dopamina de las familias D1 y D2, facilitando la vía directa o inhibiendo a la vía indirecta ([Gerfen., et al. 1990](#)). Bajo este concepto se postula que la activación de la vía directa promueve el movimiento, mientras que la estimulación de la vía indirecta lo reprime. ([Obeso y Lanciego 2011](#); [Obeso., et al. 2008, 2002, Rommelfanger y Wichmann 2010](#); [Beaulieu y Gainetdinov 2011](#)).

La disfunción en el circuito de los GB se relaciona con problemas en la actividad motora sensibles al tratamiento con fármacos con acción dopaminérgica. ([Obeso., et al 2002, 2008, 2011 y 2014](#)). Sin embargo, de todas las afecciones motoras que involucran a los GB sin duda la más relevante es la enfermedad de Parkinson. La enfermedad de Parkinson se caracteriza principalmente por la hipocinesia o pérdida de la velocidad de los movimientos voluntarios, la bradicinecia o aparición de movimientos lentos, la rigidez

postural y el temblor en reposo. Los signos característicos de los pacientes con enfermedad de Parkinson son: el tronco y las rodillas flexionadas, la disminución de la longitud de los pasos, el incremento del número de ellos y la pérdida del equilibrio (Obeso., et al. 2002). A nivel del SNC, la enfermedad de Parkinson presenta una pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la SNc, por lo que la cantidad de dopamina disminuye en los GB. La carencia de dopamina lleva a un aumento en la actividad de los núcleos de salida (GPi/SNr). Respecto a la vía indirecta, la escasez de dopamina resulta en un aumento de la actividad de las neuronas GABAérgicas estriatales. Cuando las neuronas GABAérgicas estriatales están activas se promueve la inhibición del GPe, así como la desinhibición del NST y por lo tanto a la excitación del GPi y la SNr, que posteriormente conduce a la inhibición excesiva de la vía tálamo-cortical y del cerebro medio. Por otro lado, la disminución de la actividad de las neuronas de la vía directa reduce la influencia inhibitoria en los núcleos de salida. Al liberarse de la inhibición ocurre una activación excesiva de los núcleos de salida que impide el inicio y la ejecución del movimiento (Obeso., et al 2002, 2008, 2011 y 2014 y Beaulieu y Gainetdinov 2011).

En 1990 Herkenham y colaboradores determinaron la distribución del receptor CB1 en las regiones del cerebro de diversas especies, incluido el humano. La expresión de este GPCR es abundante en los núcleos que constituyen a los GB: SNr, GP y Str (caudado-putamen), lo que sugiere su participación en la modulación de la actividad motora. Evidencia posterior demostró que el receptor CB1 se co-localiza con los receptores a dopamina (D1 y D2) en ambas vías de los GB; con el D1 en la vía directa y con el D2 en la vía indirecta. (Herkenham., et al. 1990 Kearn., et al 2004). Además de que el receptor CB1 se localiza en los axones terminales y las pre-terminales de tipo GABAérgico, también se expresa en los axones que van del NST a la SNr/GPi y la SNc, así como en las terminales cortico-estriatales donde se sabe que inhibe la liberación de glutamato (Matyas., et al. 2006; Pisani., et al. 2011).



Debido a que la expresión del receptor CB1 abunda en los GB existe interés por explorar su contribución en patologías como la enfermedad de Parkinson. Al respecto, se sabe que la activación del receptor CB1 por endocannabinoides como el 2-AG y el noladin éter disminuye la recaptura de GABA en el GP. Cabe destacar que este efecto no se observa con los agonistas WIN-55212-2 y anandamida (Venderova., et al. 2005). Esto indica que no todos los cannabinoides ejercen la misma acción sobre una terminal determinada. Más evidencia de este hecho, se aportó por experimentos donde la lesión con 6-hidroxidopamina en terminales estriatales de la vía nigro-estriatal (un modelo experimental de la enfermedad de Parkinson) lleva al aumento de la expresión de los receptores CB1 en la SNr (Walsh., et al. 2010). Adicionalmente, se demostró que las lesiones con 6-hidroxidopamina producen un incremento de la AEA y no del 2-AG en el estriado. Mientras que las lesiones que se producen por el tratamiento con la neurotoxina MPTP, incrementan la expresión del receptor CB1 en el caudado-putamen. (Pisani., et al. 2011).

La ubicación selectiva de los receptores CB1 en las terminales GABAérgicas que proyectan al GPe, su co-localización con los receptores a dopamina, su papel como modulador de la transmisión neuronal a través de la activación de diversas vías de señalización en respuesta a distintos cannabinoides, su participación en la fisiología normal de los GB, así como las alteraciones que presenta el sistema endocanabinoide en la enfermedad de Parkinson hacen que el sistema endocanabinoide, el receptor CB1 y su posible interacción con otros receptores sigan siendo un blanco atractivo de investigación.

### **3.6. La interacción del receptor CB1 con otros receptores acoplados a proteínas G.**

Las vías de señalización clásicas del receptor CB1 se han estudiado ampliamente. Sin embargo, nuevos datos indican que el receptor CB1 interactúa con otros GPCRs. Estas interacciones generan cambios en el acople

del receptor CB1 a las proteínas G, y por lo tanto activan otras vías de señalización.

Una de las interacciones de mayor controversia es la del receptor CB1 y los receptores de la familia D2-like. En relación a esto, Glass y Felder en 1997 reportaron que la activación concomitante de los receptores CB1 y D2 con sus respectivos agonistas, HU-210 y Quinpirole incrementa la formación de AMPc en los cultivos neuronales del estriado. Sin embargo, la activación de los receptores CB1 y D2 por separado inhibe la acumulación de AMPc estimulada por forskolina. Este efecto sobre la formación de AMPc se previene por el antagonista selectivo del receptor CB1 el Rimonabant (SR-141716A) (Glass y Felder 1997). Estos efectos concuerdan con trabajos realizados en nuestro laboratorio, donde la co-activación de los receptores CB1 y D2 (en presencia de dopamina endógena) estimula la liberación de GABA en las terminales del GPe. En estos trabajos se postula que este singular efecto de la activación del receptor CB1 se debe a que este receptor cambia su acople de proteínas G, es decir que puede interactuar con proteínas  $G_s$  en lugar de utilizar  $G_i$  para señalizar por lo que facilita la liberación de neurotransmisores, sin embargo no se sabe con exactitud el mecanismo por el cual ocurre este cambio de ajuste a las proteínas G (Glass y Felder 1997; Gonzalez., et al. 2009).

Algunos autores señalan que para observar este cambio de acople de proteínas G no es necesario activar al receptor D2, si no que la sola co-expresión de ambos receptores CB1 y D2 es suficiente (Jarrahian., et al. 2004). Por otro lado, el receptor CB1 además de interactuar con los receptores a dopamina también puede hacerlo con otros receptores. Así lo demuestran otros trabajos de nuestro laboratorio en el que la co-activación de los receptores CB1 con otros GPCRs promueve cambios en la vía de señalización del receptor CB1. Por ejemplo, la activación simultánea del receptor CB1 y el receptor a adenosina ( $A_{2A}$ ). El receptor  $A_{2A}$  se propone como un receptor acoplado a proteínas  $G_s$ , que estimula la formación de AMPc en presencia de dopamina; sin embargo en nuestro laboratorio demostramos que la activación simultánea del receptor  $A_{2A}$

y del receptor CB1 estimula la liberación de GABA en el GPe mediante la vía de señalización AC-AMPC-PKA, mientras que por sí solo el receptor CB1 inhibe la liberación de GABA (Paz-Bermúdez., et al. 2010). Otro ejemplo, es el de la co-activación del receptor CB1 con el receptor opioide  $\mu$ , que también estimula la liberación de GABA, pero en este caso por estimulación de la vía PLC-PKC (Caballero-Florán., et al. 2011). Probablemente los datos más recientes sobre los efectos de la co-activación de receptores a dopamina y el receptor CB1, son los que nuestro grupo de trabajo publicó utilizando experimentos de neuroquímica, donde demostraron que la co-activación CB1-D2 además de tener efectos estimulatorios sobre la liberación de GABA, también presenta efectos sobre su recaptura y aumenta la actividad motora de las ratas *in vivo*. (Munoz-Arenas., et al. 2015).

#### 4. Planteamiento del problema.

Nuestro grupo de trabajo ha reportado que la co-activación de receptores CB1 con otros receptores acoplados a proteínas G pueden aumentar la liberación de GABA en el GP por distintas vías de señalización. Estimulando la vía AC-AMPC-PKA por la interacción del receptor CB1 con el receptor A<sub>2A</sub> (Paz-Bermúdez., et al. 2010) y por la activación de la vía PLC-PKC mediante la co-activación del receptor CB1 con receptores a opioides (Caballero-Floran., et al., 2011). Además de estas interacciones hemos publicado que la activación del receptor CB1 junto con los receptores a dopamina de la familia D2-like (D2/D4) activados por dopamina endógena, tiene efectos estimulatorios sobre la transmisión GABAérgica en este mismo núcleo, proponiendo que estos resultados se deben a una modificación en la vía de señalización y/o por mecanismos a nivel de la recaptura del neurotransmisor (Gonzalez., et al. 2009; Munoz-Arenas., et al. 2015). Sin embargo, con respecto a los mecanismos que llevan al aumento de la liberación de GABA en el GP por la interacción CB1-D2, aún queda pendiente determinar algunos aspectos importantes:

- 1) Establecer con exactitud si tal efecto sobre la transmisión ocurre por la interacción del CB1 con los receptores D2 ó con los receptores D4, ya que ambos están presentes en el GP y los hallazgos anteriores no precisan si el aumento en la liberación de GABA proviene de las terminales GABAérgicas estriado-palidales (D2) y/o de las pálido-palidales (D4).
- 2) Establecer la participación de los endocannabinoides en el aumento de la liberación de GABA. Aunque se han visto un cambio en respuesta a la activación del receptor CB1 usando agonistas cannabinoides sintéticos en presencia de dopamina endógena, desde el punto de vista fisiológico es relevante saber si este efecto se lleva a cabo por endocannabinoides.
- 3) Establecer si este efecto ocurre por un cambio de acople de proteínas G<sub>i</sub> a G<sub>s</sub>, lo cual llevaría a un aumento en la producción de AMPC y por tanto a un aumento en la actividad de la PKA en las terminales.

Estas incógnitas serán abordadas y resueltas en nuestro trabajo ya que utilizaremos técnicas más sensibles como los estudios electrofisiológicos, realizaremos experimentos en ausencia de dopamina endógena y aplicaremos fármacos selectivos que bloquean las proteínas de la vía de señalización para esclarecer:

- 1) Si los efectos sobre la liberación de GABA por la co-activación de los receptores CB1-D2 se llevan a cabo en la terminal estriado-palidal.
- 2) Dilucidar la vía de señalización involucrada.
- 3) Determinar si en el fenómeno participan los endocannabinoides
- 4) Ayudar a establecer un adecuado correlato entre la respuesta celular que evoca la co-activación de este par de receptores y las observaciones sobre la conducta motora reportada en experimentos *in vivo*.

Una vez conocido esto, se podrán hacer estudios en condiciones fisiopatológicas como lo es el Parkinson en donde se ha visto que la expresión de estos receptores se modifica; y de esta manera ofrecer alternativas terapéuticas para este y otros padecimientos de los GB.

## **5. Hipótesis.**

La co-activación de los receptores CB1-D2 en las terminales estriado-palidales, estimula la liberación de GABA por un cambio en la vía de señalización de proteínas  $G_i$  a  $G_s$  estimulando la vía AC-AMPC-PKA.

## **6. Objetivo:**

Estudiar la vía de señalización y los mecanismos que participan en los efectos de la co-activación de los receptores CB1-D2 en las terminales estriado-palidales.

### **6.1. Objetivos específicos.**

- Obtener evidencia electrofisiológica de la estimulación de la liberación de GABA en el globo pálido por la co-activación de los receptores CB1 y D2 con los agonistas farmacológicos utilizando la técnica de estimulación de pulsos pareados.
- Obtener evidencia electrofisiológica del posible efecto estimulador y el cambio de acople por la activación de los receptores CB1 por endocannabinoides.
- Obtener evidencia electrofisiológica del cambio de acople de proteínas Gi a Gs de los receptores CB1 por restricción de las proteínas Gi con la toxina pertussis (PTX).
- Demostrar la participación de la vía AC-AMPC-PKA en la co-activación de receptores CB1 y D2.
- Estudiar el efecto de la inhibición de la PKA sobre la co-activación de los receptores y la liberación de GABA con la técnica del par de pulsos y durante la restricción de proteínas Gi con la PTX.
- Estudiar el efecto de la co-activación de receptores sobre la formación de [<sup>3</sup>H]-AMPC en rebanadas de Globo Pálido.

## **7. Materiales y Métodos.**

### **7.1. Animales.**

Para los registros electrofisiológicos se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6 (C57 black 6) de sexo indistinto, de 12 a 14 días de nacidos.

En el caso de los experimentos de acumulación de [<sup>3</sup>H]-AMPc se utilizaron ratas macho de las cepa Wistar de 200-220g de peso.

Ambos tipos de animales se suministraron por La Unidad de Producción de Animales de Laboratorio (UPEAL) del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV/Fisiología); institución regida por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 sobre las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

### **7.2. Obtención de rebanadas.**

#### **7.2.1. Obtención de rebanadas de cerebro de ratón para registro electrofisiológico.**

Los ratones se decapitaron para la posterior extracción del cerebro. El cerebro se removió rápidamente y se incubó en baño de hielo a 4°C en líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF) cuya concentración en mM fue: 62.5NaCl, 2.5KCl, 1.25KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26NaHCO<sub>3</sub>, 5MgCl<sub>2</sub>, 0.5CaCl<sub>2</sub>, 20Glucosa, 100 Sucrosa, pH=7.4 burbujeado con una mezcla saturada de 95%O<sub>2</sub> +/- 5% CO<sub>2</sub>. El cerebro se dividió en dos hemisferios los cuales se montaron en una cámara de incubación que se adapta a un vibrátomo (World Precision Instruments-NVSLM1) para la obtención de las rebanadas para-sagitales de 250-300 μM de grosor a una inclinación de 25-30° para favorecer la conservación de la vía estriado-palidal. Una vez obtenidas las rebanadas, se estabilizaron durante una hora en solución fisiológica artificial con concentración de mM por 125NaCl,



3KCl, 1.25KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 2.5 CaCl<sub>2</sub> y 10 de glucosa saturada a de 95%O<sub>2</sub> +/- 5% CO<sub>2</sub> y pH=7.4. Después de la estabilización, las rebanadas se colocaron en una cámara de registro a temperatura ambiente donde fueron perfundidas continuamente con un volumen constante de 2-3 mL/min con solución fisiológica para la obtención de registros electrofisiológicos.

### **7.2.2. Obtención de rebanadas de globo pálido de rata para los experimentos de acumulación de [<sup>3</sup>H]-AMPc.**

Para los experimentos de acumulación de AMPc las ratas fueron pretratadas con reserpina (10mg/Kg de peso) 16 Horas antes de cada ensayo. Posteriormente fueron sacrificadas y decapitadas para la obtención del cerebro, una vez obtenido el cerebro se obtuvieron rebanadas de corte coronal de 300 a 350 micras de grosor para posteriormente obtener el Globo Pálido. Durante este proceso el tejido se mantuvo en baño de hielo a 4°C en la solución fisiológica Krebs-Henseleit cuya composición en mM es: 124.5NaCl, 3KCl, 1 MgSO<sub>4</sub>, 1.2KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.8CaCl<sub>2</sub>, 16.5NaH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y 11 de glucosa, a un pH=7.4 a burbujeo constante con una mezcla de CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>, 5/95% respectivamente.

### **7.3. Acumulación de [<sup>3</sup>H]-AMPc.**

Los ensayos de AMPc se realizaron como lo reporta Rangel-Barajas y colaboradores en el 2011. Obteniendo sinaptosomas aislados de rebanadas de GP. Las rebanadas se homogenizaron en buffer (Sucrosa, 0.32 M; HEPES, 0.005 M, pH=7.4), posteriormente los homogenados se centrifugaron a 800 G por 10 minutos. Se obtuvo el sobrenadante, el cual se centrifugó a 20,000 G por 20 min. De esta segunda centrifugación, se obtiene el sobrenadante (S1) el cual fue desechado y el pellet se resuspendió en la solución fisiológica Krebs-Henseleit cuya concentración en mM es: 127NaCl, 1.75KCl, 1.18MgSO<sub>4</sub>, 1.25KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.8CaCl<sub>2</sub>, 20HEPES, 11 glucosa, y 1 3-isobutil-1-metilxantina. Posteriormente, se incubó en [<sup>3</sup>H]-Adenina (130 nM) durante una hora a 37°C. Se adicionaron 10 µL de fármaco a las muestras de 250 µL que contenían los sinaptosomas. La exposición a los fármacos fue por un periodo 10 minutos y se

interrumpió con 100  $\mu$ L de solución de paro (ácido tricloroacético al 15%, ATP 2.5 mM y AMPc 4.5 mM) después de 20 minutos de estabilización en hielo se centrifugaron las muestras a 4000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente tomamos el sobrenadante y lo colocamos en las columnas Dowex, estas se activaron previamente con 1 mL de HCl y 4 mL de agua (la activación de columnas se realiza por duplicado), se elimina el primer goteo y posteriormente se agregan a la columna 3 mL de agua desionizada, dejando eluir y colectando la elución (muestra 1); en esta fracción colectamos el [ $^3$ H]-ATP. Posteriormente las columnas se colocan sobre columnas de alúmina (eluidas previamente con 4 mL de 0.1 M de imidazol a un pH=7.5), se adicionan 4 mL de una solución Tris-Base a 50 mM con un pH=7.5 y se colecta la muestra 2; en esta fracción obtenemos el [ $^3$ H]-AMPc. Para el análisis, la radioactividad obtenida de ambas fracciones se cuantificó por centellometría líquida, expresando el resultado como el porcentaje de [ $^3$ H]-AMPc. A partir de la siguiente fórmula:

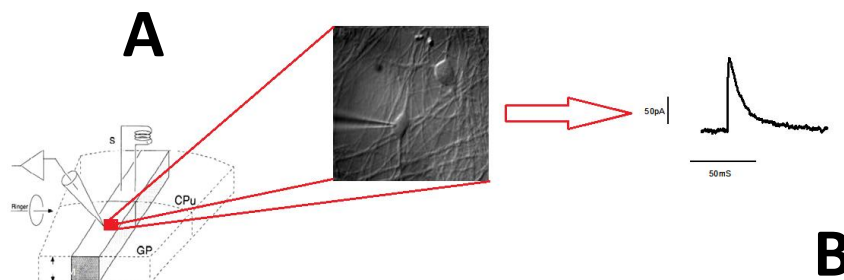
$$\% \text{ [}^3\text{H]-AMPc} = \frac{\text{[}^3\text{H]-AMPc}}{\text{[}^3\text{H]-ATP} + \text{[}^3\text{H]-AMPc}} \times 100$$

#### **7.4. Registro de las corrientes post-sinápticas inhibitorias evocadas (CPIe) por par de pulsos en globo pálido externo (GPe).**

Para los registros en la configuración de célula completa se utilizaron pipetas de borosilicato con resistencia de 3-6 M $\Omega$  que contenían en mM: 135 K-Gluconate, 4 NaCl, 0.4 GTP, 2 Mg-ATP, 0.5 EGTA y HEPES 10 a un pH=7.2. Las neuronas se visualizaron en el microscopio (objetivo de inmersión en agua 40X). Una vez que la pipeta de registro estaba dentro del baño se aplicó presión positiva y se bajó hasta alcanzar la célula objetivo. Las células se eligieron tomando en cuenta su viabilidad y no por el tamaño o forma del soma ([Cooper y Stanford 2000](#)). Al contacto con la membrana y aplicando presión negativa se

tuvieron sellos de contacto hermético en el orden de 10-20 G $\Omega$  (Cooper y Stanford 2000), después se rompió el parche de la membrana aplicando mayor presión negativa, una vez obtenida la configuración de célula completa (Whole Cell), el potencial de acción y las corrientes de membrana se monitorearon usando un amplificador Axopatch 200A (Axon instruments). La resistencia de acceso fue del rango de 5-20 M $\Omega$ . La resistencia de acceso y la corriente de holding se checkaron de manera intermitente durante todo el experimento, los experimentos con cambios mayores al 20% en estos parámetros se descartaron.

Una vez obtenida la configuración de célula completa (Whole cell), con fijación de voltaje a -50 mV en la neurona palidal y dando pulsos de voltaje despolarizantes a nivel del estriado a intervalos regulares, se registraron corrientes post-sinápticas salientes en presencia del CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona) (10  $\mu$ M) y DL-2-fosfonopentanoico (DL-AP-5 ó APV) (100  $\mu$ M) (Ilustración 2). Estas corrientes de salida fueron dependientes de voltaje con inversión de su polaridad a -64 mV, un potencial de inversión muy cercano al potencial de equilibrio del cloro teórico calculado ( $E_{Cl}$ ) sensibles a bicuculina (10  $\mu$ M).



**Ilustración 2.** Esquema representativo de la ubicación del electrodo de estimulación (S) ubicado en el núcleo estriado (CPu) y la pipeta de registro ubicada en el Globo Pálido (GP)(A). (B) trazo característico de una corriente posináptica inhibitoria registrada en el GP a por fijación de voltaje a -50 mV en presencia de CNQX y APV. Pipetas llenadas con Gluconato de potasio ( $E_{Cl}$ , -64 mV).

Una vez caracterizadas las corrientes, los eventos sinápticos se provocaron por pulsos bipolares individuales de 0.5 ms con una intensidad de 0.1-10 mV a intervalos de 50 ms entre cada pulso. Los registros de corriente y de voltaje se generaron usando el software pCLAMP version 8.0 (Axon instruments), las corrientes de membranas resultantes fueron filtradas a 2 kHz y se almacenaron para su posterior análisis usando el programa Clampfit version 10.0. Los registros se obtuvieron con una fijación de voltaje a -50 mV (Stanford y Cooper 1999).

Los fármacos a estudiar se perfundieron reemplazando el aCSF por otro de la misma composición junto con el fármaco de interés a una concentración conocida. El registro de las corrientes post-sinápticas inhibitorias evocadas (CPIe) siempre se realizó en presencia de 6-cyano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX) 10 $\mu$ M, ácido DL-2-fosfonopentanoico (DL-AP-5) 100 $\mu$ M (antagonistas glutamatérgicos) para bloquear las corrientes de Ca<sup>2+</sup> dependientes de AMPA y Kainato. (Stanford y Cooper 1999).

Para su análisis se tomó como control el promedio de la amplitud de las corrientes, tres min antes de la adición del fármaco de interés y 5 min después del fármaco. Para el cociente del par de pulsos se utilizó el promedio de cuatro registros del cociente de la amplitud de la corriente al pulso 1 (P1) y de la amplitud de la corriente al pulso 2 (P2). Utilizando la siguiente fórmula: Cociente = P2/P1. Antes y después de la presencia de fármaco; y antes y después del pulso despolarizante en los experimentos de la supresión de la inhibición por despolarización (DSI).

#### **7.5. El DSI en registros de corrientes post-sinápticas inhibitorias evocadas.**

Bajo las mismas condiciones de registro en presencia del CNQX y el AP-5 se registraron corrientes post-sinápticas inhibitorias evocadas por par de pulsos. Dando pulsos despolarizantes desde el potencial de fijación de voltaje (-50 mV) a 0 mV durante un periodo de 10 s (Yanovsky, et al. 2003). Utilizando dos tipos de concentraciones de EGTA intracelular en la pipeta de registro: una

alta/media de 5 mM y otra baja de 0.2 mM para variar la disponibilidad del  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular. El pulso despolarizante se efectuó 5 min después de la condición control en las condiciones basales y 10 min después de la adición del fármaco de estudio. Para su análisis se tomó el promedio de la amplitud de las corrientes tres min antes de la despolarización y tres min después de la despolarización. En el caso de fármaco bajo estudio, se tomó como control el promedio de la amplitud de las corrientes tres min antes de la adición del fármaco de interés. Para el cociente del par de pulsos se utilizó el promedio de cuatro registros del cociente de la amplitud de la corriente al pulso 1 (P1) y de la amplitud de la corriente al pulso 2 (P2). Utilizando la siguiente fórmula:  $\text{Cociente}=\text{P2/P1}$ . Antes y después de la despolarización; y antes y después de la presencia de fármaco.

#### **7.6. Registros de corrientes post-sinápticas inhibitorias evocadas en presencia de PTX.**

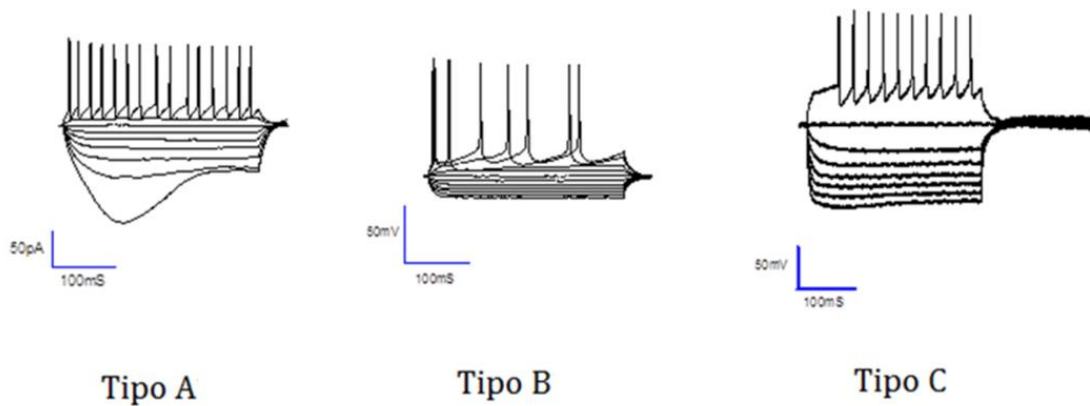
Para los registros en presencia de la toxina pertussis (PTX), las rebanadas se incubaron en una aCSF cuya concentración en mM es: 125 NaCl, 3 KCl, 1.25  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 26  $\text{NaHCO}_3$ , 1  $\text{MgCl}_2$ , 2.5  $\text{CaCl}_2$  y 10 de glucosa saturada a 95%  $\text{O}_2$  +/- 5% de  $\text{CO}_2$  y  $\text{pH}=7.4$ . Por un periodo de 12 a 18 hrs. a una concentración de 5  $\mu\text{g/mL}$  (Azad, et al. 2003 y Misner y Sullivan 1999). El registro de las corrientes evocadas es el mismo descrito anteriormente.

## **8. Resultados.**

### **8.1. Estimulación de la liberación de GABA por co-activación de los receptores CB1 y D2.**

#### **8.1.2. Caracterización electrofisiológica de las neuronas del GPe.**

Antes de estudiar los efectos presinápticos de la activación de los receptores CB1 y D2 se realizó una caracterización electrofisiológica de las neuronas palidales, con el fin de compararlas con las reportadas en la literatura y ver si estábamos en condiciones experimentales equiparables. Se obtuvieron rebanadas sagitales de cerebro de 300 a 350  $\mu\text{m}$  de grosor. Una vez ubicado el GPe, caracterizamos electrofisiológicamente las neuronas palidales con base en lo reportado por Cooper y Stanford en el 2000. Las neuronas palidales se diferencian por tres características: 1) la forma y la latencia del potencial de acción (Umbral, Overshoot y AHP), 2) la frecuencia del disparo durante la inyección de corrientes despolarizantes y/o la actividad espontánea quiescente y 3) las deflexiones en el voltaje por corrientes de tipo  $I_h$  a potenciales de membrana negativos. Usando este criterio encontramos los tres tipos de neuronas palidales: 1) Células de Tipo A. En estas células los pulsos hiperpolarizantes desenmascaran una corriente de rectificación entrante y presentan un potencial de acción con mayor latencia que el de las neuronas del Tipo B, además estas neuronas no presentan actividad intrínseca y muestran un AHP prolongado; 2) Las neuronas de Tipo B carecen de la corriente rectificadora  $I_h$ , presentan un AHP más corto y algunas tienen actividad quiescente (actividad espontánea); y 3) Las neuronas Tipo C no presentan actividad espontánea ni tampoco deflexiones en el voltaje por corrientes  $I_h$  a potenciales de membrana menores a  $-80\text{ mV}$ . De las neuronas caracterizadas en este trabajo, 18% fueron del tipo A, 48% del tipo B y 34% del tipo C, de un total de 42 neuronas analizadas (Figura 1).



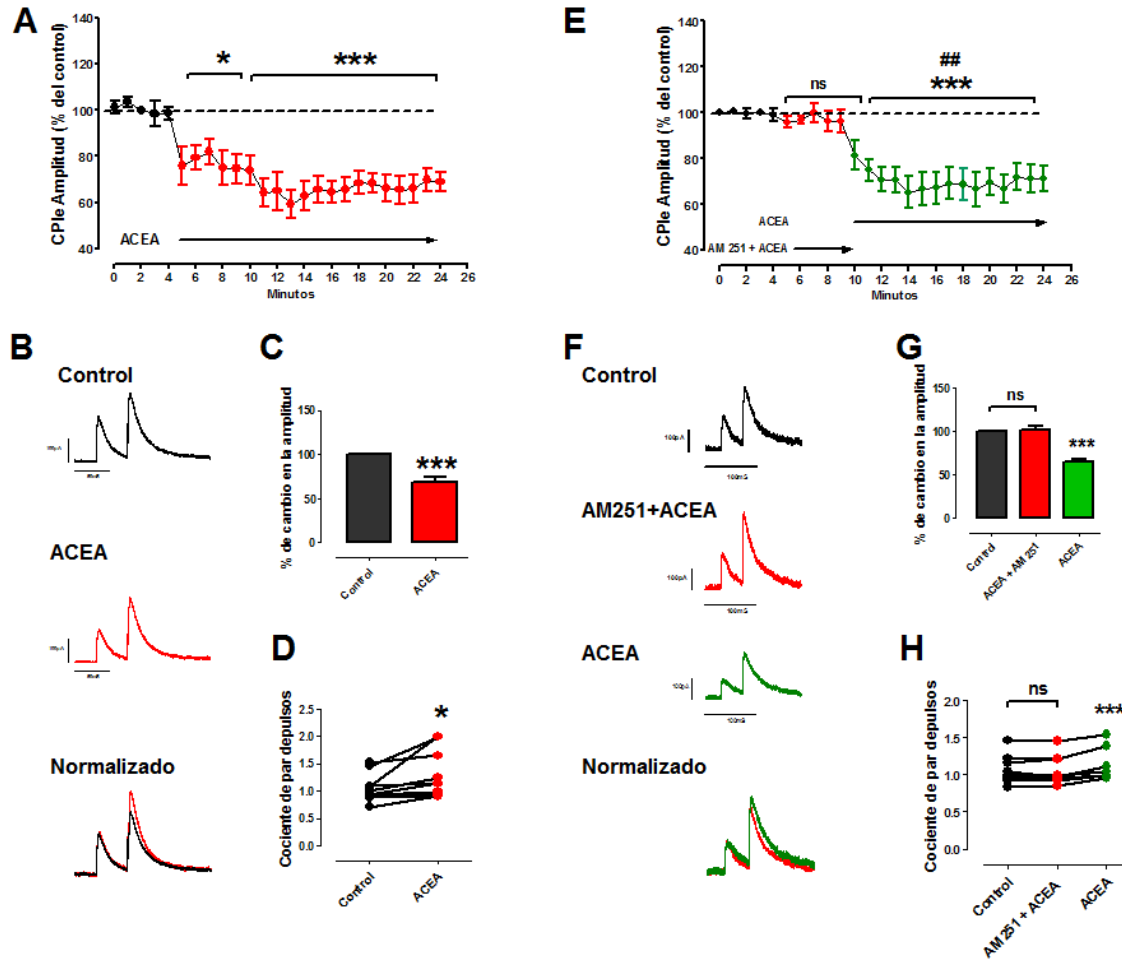
*Figura 1. Caracterización electrofisiológica de los tres subtipos de neuronas del GPe. Se muestran los trazos representativos de los tres tipos neuronales hallados en el GP. Modificación en el voltage por la inyección de pulsos hiperpolarizantes y despolarizantes de corriente, con una duración de 300 ms a intervalos de 25 pA con 5 s de diferencia. Potencial de membrana entre 50 y 60 mV. 18% fueron del tipo A, 48% del tipo B y 34% del tipo C, de un total de 42 neuronas analizadas*

### **8.1.3. El efecto inhibitorio sobre la liberación de GABA producida por el agonista del receptor CB1, ACEA se vuelve estimulador en presencia del agonista del receptor D2, Quinpirole; efecto mediado por la PKA.**

Después de la caracterización y previo a evaluar el efecto de la co-activación de receptores CB1 y D2 sobre la liberación de GABA de la vía estriado-palidal, exploramos el efecto de la activación de los receptores CB1, para luego co-activarlos con los receptores D2. Para ello con la técnica del par de pulsos, examinamos el efecto de los agonistas selectivos: ACEA para los receptores CB1 y Quinpirole para los D2, y medimos el curso temporal de la amplitud de las CPIe y el cociente del par de pulsos (CPP). La perfusión del ACEA (1  $\mu$ M) redujo un  $68 \pm 5\%$  la amplitud de la corriente con respecto del control (**Figura**

2A y 2C), además produjo un incremento del CPP (Control=100% +ACEA=68±5%, n=11 p<0.001 t-test, Figura 2C. CPP: Control= 1.04±0.07, +ACEA=1.27±0.12, n=11 p<0.05 t-test. Figura 2D). Estos cambios en el CPP sugieren que el receptor CB1 tiene efecto a nivel pre-sináptico. Para verificar que el efecto inhibitorio del ACEA sobre las corrientes GABAérgicas es dependiente del receptor CB1, se utilizó al AM251 (100 nM) un antagonista selectivo de los receptores CB1 (Gonzalez., et al. 2009). Utilizamos esta concentración, porque en nuestros estudios neuroquímicos se observó que previene el efecto inhibitorio del ACEA. El AM251 previno el efecto inhibitorio del ACEA, sin cambios con respecto del control (control=100%; AM251 + ACEA=102±4%; ACEA=64±3%; p<0.001 para ACEA respecto del control y ACEA respecto AM251+ACEA, n= 8) (Figuras 2E y 2G). El efecto sobre la inhibición en la amplitud de las corrientes y el incremento en el par de pulsos producidos por el ACEA se muestra en las Figuras 2G y 2H. (Control=1.08±0.07; AM251+ACEA=1.07±0.07; ACEA=1.18±0.07; ACEA p<0.001 con respecto del Control y AM251+ACEA, n= 8).





**Figura 2.** El agonista selectivo del receptor CBI, ACEA disminuye la amplitud de las CPlE por estimulación del estriado, y aumenta el cociente en el par de pulsos (CPP). Estos efectos se previenen por el antagonista selectivo del CBI, AM251. (A) y (E) Curso temporal de los cambios inducidos por ACEA (1  $\mu$ M) (en %, n=5). (B) y (F) Trazos representativos de las corrientes de GABA evocadas en el estriado por el método de par de pulsos y registrados en las neuronas del GPe. En (B) las CPlE se normalizaron con respecto de las primeras CPlE del trazo sobrepuesto. (C) y (D) muestran el resumen de los cambios en la amplitud y el CPP obtenidos en experimentos de manera independiente. El ACEA (1  $\mu$ M) tiene un efecto inhibitorio sobre la amplitud e incrementa el cociente del par de pulsos (CPP) (n=8). (G) y (H) ilustran el bloqueo del efecto inhibitorio del ACEA (1  $\mu$ M) con el AM251 (100 nM) bajo

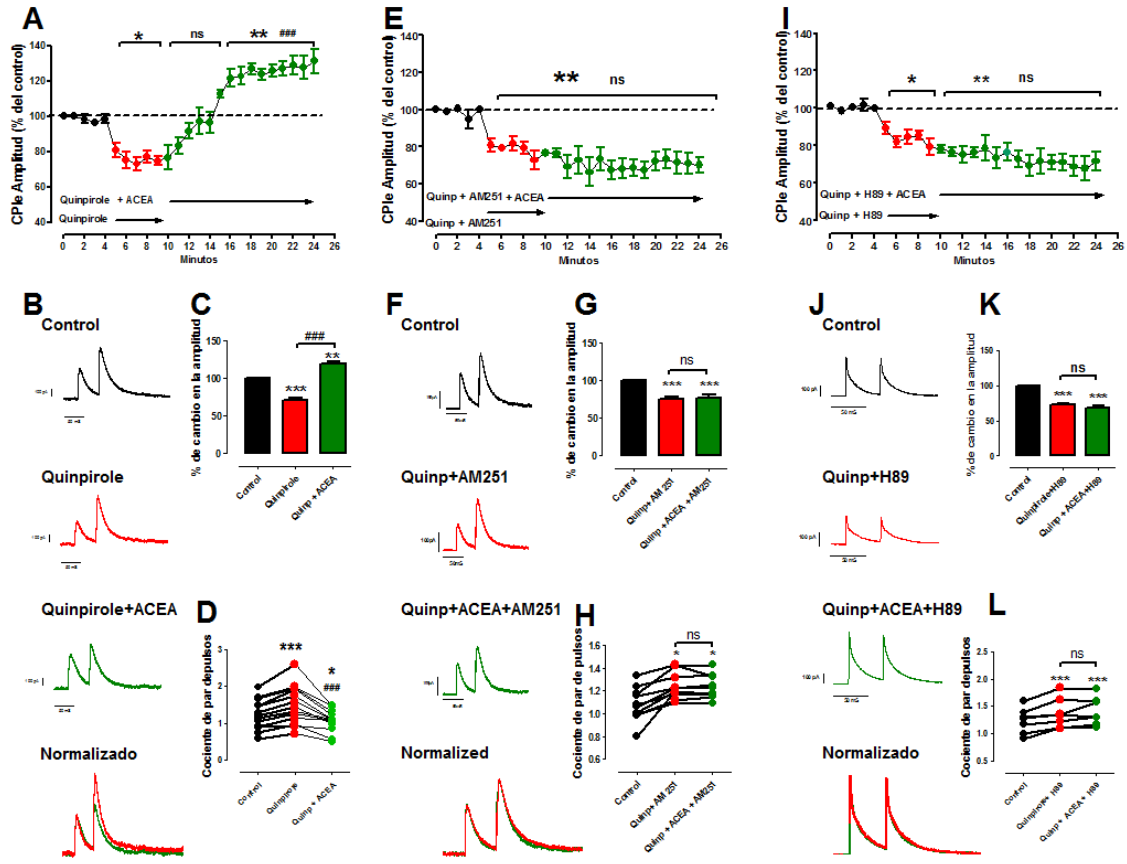
*los mismos parámetros (n=11). En (F) se muestran los trazos comparativos entre el efecto inhibitorio del ACEA (1  $\mu$ M) y la prevención del efecto inhibitorio con ACEA (1  $\mu$ M) +AM251 (100 nM). (\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001 diferencia significativa con respecto del control y ns, sin diferencia significativa, ANOVA seguida de una prueba de Tukey, media  $\pm$  error estándar).*

Posteriormente, se investigó el efecto del receptor D2 sobre las CPIe; para lo cual, se utilizó la misma estrategia experimental y durante la inhibición de la liberación evocada por estos receptores se activaron los receptores CB1. La activación de los receptores D2 con el Quinpirole disminuyó la amplitud de las CPIe e incrementó el CPP. (Control=100%, vs Quinpirole = 71 $\pm$ 3%, n=13  $p$ <0.001. CPP =1.24 $\pm$ 0.11 a 1.50 $\pm$ 0.15 n=13,  $p$ <0.001) (Figuras 3A, 3C y 3D). Una vez validado este efecto en nuestro sistema, se investigó si el efecto se podía modificar activando al receptor CB1 (como lo reportó González y colaboradores en el 2009). La estimulación del receptor CB1 con el ACEA previa activación del receptor D2 con su agonista, el Quinpirole, aumenta la amplitud de las CPIe y disminuye el cociente del par de pulsos (control=100%; Quinpirole+ACEA=119 $\pm$ 2%, n=13,  $p$ <0.001; CPP Control 1.24 $\pm$ 0.11: Quinpirole+ACEA 1.07 $\pm$ 0.08,  $p$ <0.05, n=13) (Figuras 6A–6D).

Luego evaluamos si el efecto estimulador del ACEA (1  $\mu$ M) sobre la amplitud de las CPIe en presencia del Quinpirole (1  $\mu$ M) se prevenía por el antagonista del receptor CB1, el AM251 (100 nM) y así determinar si este efecto es mediado por este receptor. Encontramos que el bloqueo del receptor CB1 efectivamente previene el efecto estimulador de la amplitud (control = 100%; Quinpirole + AM251 = 75  $\pm$  3%; Quinpirole + ACEA + AM251 = 77  $\pm$  4%; Quinpirole + ACEA + AM251:  $p$ <0.001 respecto del control y que no es significativo respecto a Quinpirole + AM251, n = 10) (Figura 3E y 3G), y también la disminución del cociente del par de pulsos previamente observada. (Control = 1.08  $\pm$  0.05; Quinpirole + AM251 = 1.24  $\pm$  0.04; Quinpirole +

ACEA + AM251 =  $1.23 \pm 0.03$ ; Quinpirole + AM251 + ACEA:  $p < 0.001$  respecto del control y no significativos respecto de la condición Quinpirole + AM251, n = 10) (Figura 3F y 3H).

Glas y Felder en 1997 reportaron que la co-activación de los receptores CB1-D2 en los cultivos de neuronas estriatales podía estimular la formación de AMPc. El aumento de este segundo mensajero podría dar lugar al incremento de la PKA y por tanto ser responsable del aumento de la liberación de GABA en la terminal tal como lo reportó González y colaboradores en el 2009. Por tanto investigamos si el efecto estimulador de los receptores CB1-D2 se previene por el H-89 (10  $\mu$ M), un bloqueador de la PKA. El H-89 abolió el efecto estimulador producido por la co-activación de los receptores CB1-D2 con sus respectivos agonistas (Figuras 3I y 3K); (control = 100%; Quinpirole + H89 =  $73 \pm 2\%$ ; Quinpirole + H89 + ACEA =  $68 \pm 3\%$ ; Quinpirole + H89 + ACEA:  $p < 0.001$  respecto del control y no significativo respecto del Quinpirole, n = 10). De igual manera, el H-89 previene el efecto sobre la disminución en el CPP. (Control =  $1.17 \pm 0.07$ ; Quinpirole + H89 =  $1.30 \pm 0.08$ ; Quinpirole + H89 + ACEA =  $1.34 \pm 0.07$ ; Quinpirole + H89:  $p < 0.001$  respecto del Control y no significativo respecto del Quinpirole, n=10. (Figuras 3J y 3K).



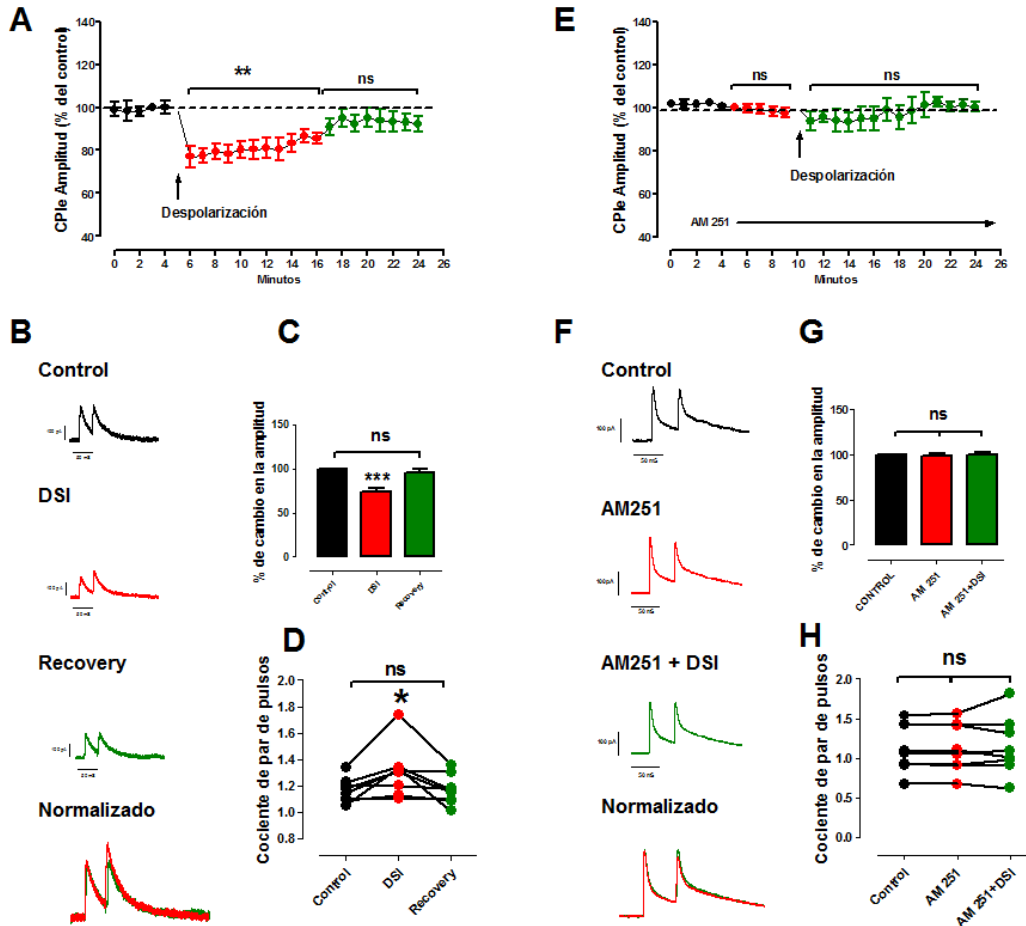
**Figura 3.** El agonista selectivo del CB1, ACEA incrementa la amplitud de las CPIe cuando se administra a las rebanadas tratadas previamente con Quinpirole, este efecto se previno por la presencia del AM251 y H-89. (A) y (C) El agonista selectivo del CB1, ACEA (1  $\mu$ M) incrementa la amplitud de las CPIe cuando se administra junto con el agonista del receptor D2 Quinpirole (1  $\mu$ M); el Quinpirole siempre reduce la amplitud de las CPIe. (E) y (G) muestran que el efecto estimulador del ACEA se previene por el antagonista del receptor a cannabinoides CB1, AM-25, (I) y (K) ilustra que el efecto estimulador del ACEA también se previene por el bloqueador de la PKA, H-89. (A), (E), e (I) indican los cursos temporales sobre las CPIe (en %,  $n=5$ ). (B), (F) y (J) muestran los trazos representativos de las corrientes de GABA evocadas por el par de pulsos en el estriado y registrados en neuronas de GPe. Las CPIe se normalizaron con respecto a la primera CPIe del trazo,

*los trazos se sobrepusieron para comparar las condiciones: Quinpirole (1  $\mu$ M); Quinpirole (1  $\mu$ M) + ACEA (1  $\mu$ M); Quinpirole (1  $\mu$ M) + AM-251 (100 nM) y Quinpirole (1  $\mu$ M) + ACEA (1  $\mu$ M) + AM-251 (100 nM) respectivamente. (D), (H) y (L) resume el CPP obtenido de experimentos independientes (n=10, 13 y 10 respectivamente). (\*p<0.01, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 diferencia significativa con respecto del control y ns, sin diferencia significativa, ANOVA seguida de una prueba de Tukey, media  $\pm$  error estándar).*

#### **8.1.4. Los endocannabinoides pueden activar los receptores CB1 e inhibir la liberación de GABA. La activación de receptores D2 también vuelve estimulador el efecto.**

Después de evaluar los efectos sobre la liberación de GABA en la co-activación de los receptores por agonistas farmacológicos, decidimos investigar si tal efecto estimulador sobre la liberación de GABA podría reproducirse por actividad de cannabinoides endógenos. Para ello se realizaron experimentos con la técnica electrofisiológica del DSI. El DSI es la inhibición de la liberación de neurotransmisor en las terminales pre-sinápticas que se produce por la despolarización de la neurona post-sináptica. El bloqueo de este fenómeno por antagonistas cannabinoides indica que el DSI se produce por la liberación de endocannabinoides en la región post-sináptica (Wilson y Nicoll 2002; Freund., et al. 2003; Diana y Marty 2004). En nuestro sistema al incrementar el potencial de membrana de las neuronas palidales de -60mV a 0mV por periodos de 10 s, la amplitud de las CPIe se disminuye por un periodo significativo de tiempo (15 minutos) (Figura 4A). El incremento en el cociente del par de pulsos (CPP) y los cambios en la amplitud provocados por la despolarización sugieren un cambio que se produce en la región pre-sináptica (Cambios en la amplitud: Control = 100%, DSI =  $74 \pm 3\%$ , DSI recuperación =  $95 \pm 4\%$ ; p<0.001, Control vs DSI y DSI vs recuperación, n = 8, Figura 4C. Cambio en el CPP: Control =  $1.17 \pm 0.03$ , DSI  $1.31 \pm 0.07$ , recuperación  $1.17 \pm 0.04$ , p<0.05. DSI

vs ambos Control y recuperación = 8, Figuras 4B y 4D). Esta inhibición se previene por el AM251, el antagonista selectivo del receptor CB1 (Figura 4E) (Cambios en la amplitud: Control = 100%; AM251 =  $98 \pm 2\%$ ; AM251 + DSI =  $99 \pm 3\%$ ; sin diferencia significativa respecto del control, n = 8, Figura 4G. Cambio en el CPP: Control =  $1.13 \pm 0.10$ , AM251 =  $1.13 \pm 0.10$  y AM251 + DSI =  $1.15 \pm 0.12$ , sin diferencia significativa respecto del Control n = 8, Figura 4H). Este resultado señala que el efecto inhibitorio sobre la liberación de GABA provocado por el DSI es mediado por endocannabinoides.

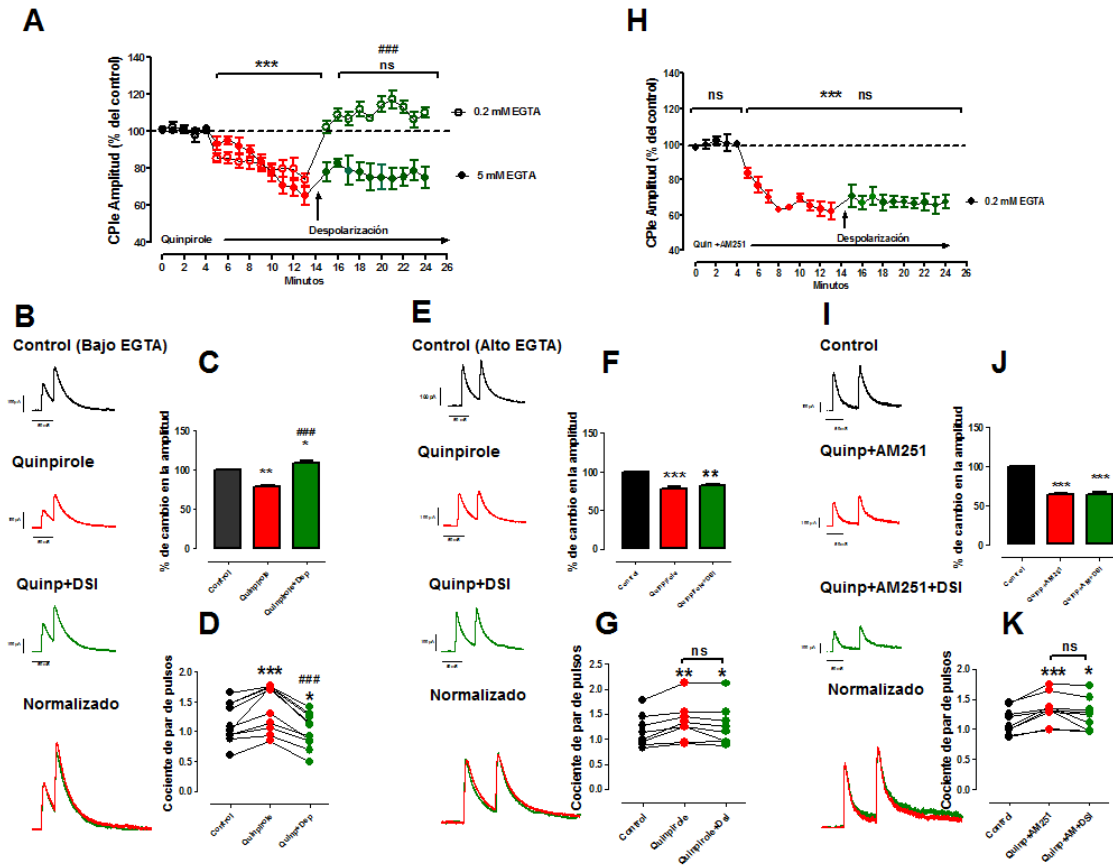


**Figura 4. El DSI inhibe la amplitud de las CPIe; este efecto se previene por el AM251. La despolarización de las neuronas del GPe (de -60mV a 0mV por 10 segundos con EGTA (0.2 mM) en la pipeta de registro) disminuye la amplitud de las CPIe por estimulación estriatal e incrementa el CPP. El AM251 previene este efecto. (A) y (C) muestran el curso temporal del DSI (en %, n=5) y el resumen el efecto inhibitorio sobre la amplitud de las CPIe (n=8). (E) y (G) ilustran que la inhibición por el ACEA se previene por acción del antagonista selectivo del CB1, el AM251 (100nM). (B) y (F) muestran los trazos representativos de las corrientes de GABA generadas por aplicar un par de pulsos en el estriado. Las CPIe se normalizaron con respecto de las CPIe producidas por el primer pulso y el trazo se sobrepuso, para (B) el DSI vs recuperación y para (F) AM251 vs AM251 + DSI. (D) y (H) resumen el**

*CPP de los experimentos independientes. El DSI provoca un incremento del CPP (n=8), este efecto se bloquea por el AM251. (\*\*p<0.01, diferencia significativa con respecto del control y ns, sin diferencia significativa, ANOVA seguida de una prueba de Tukey, media ± error estándar).*

Una vez mostrada la activación de receptores CB1 por endocannabinoides realizamos la co-activación de los receptores D2 con Quinpirole (1 μM). En esta condición el pulso despolarizante del DSI provocó un incremento de la amplitud de las CPIe y una disminución en el cociente del par de pulsos (**Figura 5**) (Cambio en la amplitud: control = 100%; Quinpirole = 78 ± 2%; Quinpirole + despolarización = 109 ± 3%; Quinpirole + despolarización vs Control. P<0.05; Quinpirole vs Quinpirole + despolarización: p<0.001, n = 10, **Figura 5C**). CPP: control = 1.15 ± 0.10, Quinpirole = 1.50 ± 0.17, Quinpirole + despolarización = 1.18 ± 0.11; Quinpirole + despolarización vs Quinpirole: p<0.001 y vs Control p<0.05, n = 10, **Figura 5D**). La adición al medio de AM251 previno el aumento de la despolarización observado con 0.2 mM de EGTA en la solución interna (Cambio en la amplitud: control = 100%, Quinpirole + AM251 = 64 ± 2%, Quinpirole + AM251 + DSI 65 ± 2%; Quinpirole + AM251 + despolarización, p<0.001 vs control y sin cambio significativo respecto del Quinpirole + AM251, n = 9, **Figura 5J**). Cambio en el CPP: Control = 1.13 ± 0.07; Quinpirole + AM251 = 1.33 ± 0.08; Quinpirole + AM251 + DSI = 1.24 ± 0.09; Quinpirole + AM251 + DSI = p<0.05 vs Control y sin significativo respecto de Quinpirole + AM251, n = 9, **Figura 5K**). Estos resultados indican que el efecto estimulador sobre la liberación de GABA por co-activación de receptores CB1-D2 puede ser también mimetizado por endocannabinoides.





*Figura 5. La inhibición de las CPIe producida por el Quinpirole se vuelve estimuladora cuando se libera canabinoide endógeno por la despolarización de la neurona post-sináptica. (A) y (H) muestran que el DSI en presencia del Quinpirole produce un efecto estimulador sobre las corrientes post-sinápticas de manera dependiente de los niveles de  $Ca^{+2}$  intracelular. Este efecto se previene por el AM251. (A) muestra el curso temporal de la amplitud de las CPIe (en %,  $n=5$ ) con dos concentraciones diferentes de EGTA en la pipeta de registro. (B,  $n=10$ ), (E,  $n=10$ ) e (I,  $n=9$ ) ilustran los trazos superpuestos de las corrientes de GABA provocadas por la aplicación del par de pulsos en el estriado; (B) y (E) son trazos para Quinpirole vs Quinpirole + despolarización e (I) trazos para Quinpirole + AM251 + despolarización. (D), (G) y (K) son los cocientes obtenidos por el par de pulsos de experimentos independientes donde Quinpirole siempre incrementa*

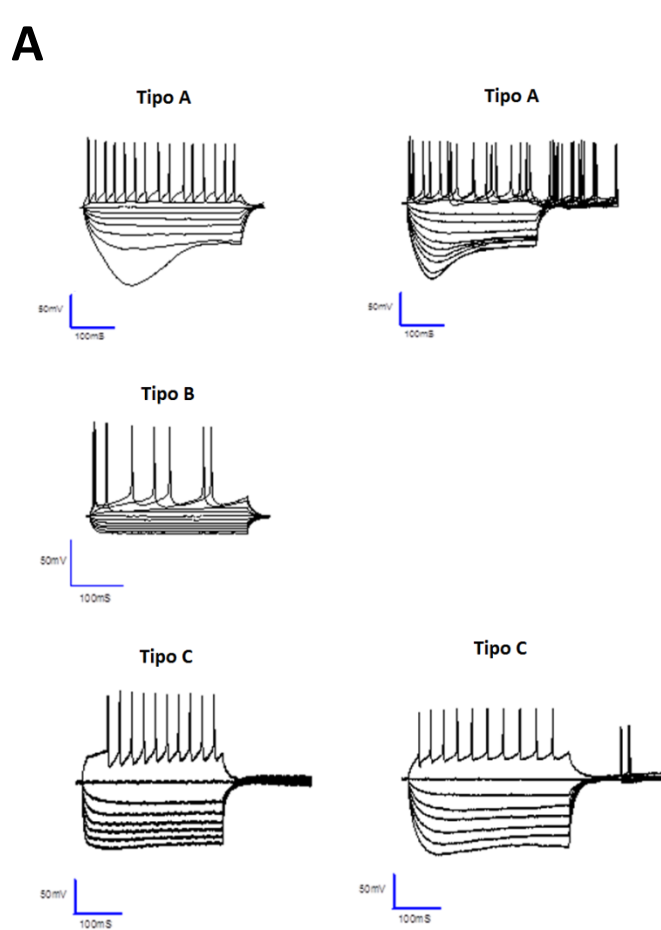
*el CPP mientras que la despolarización por la disminución de la concentración de EGTA (0.2mM) lo decrece, este efecto se previene por el AM251 ((H), (I), (J) y (K)) (n=10 y 8 respectivamente). (\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 diferencia significativa con respecto del control y ns, sin diferencia significativa, ANOVA seguida de una prueba de Tukey, media ± error estándar).*

La síntesis de endocannabinoides es un evento dependiente del aumento de calcio intracelular, ya que es un requisito para la actividad enzimática, por ello para probar aún más que el DSI que estamos usando provoca la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  y síntesis de endocannabinoides incrementamos la capacidad de amortiguamiento del  $\text{Ca}^{+2}$  en la solución de la pipeta, aumentado el EGTA a 5mM. Esta estrategia redujo la magnitud de la respuesta provocada por la despolarización (Cambio en la amplitud: control = 100%; Quinpirole:  $77 \pm 3\%$ ; Quinpirole + DSI =  $82 \pm 2\%$ ; Quinpirole + DSI vs Control:  $p<0.01$ ; Quinpirole + DSI vs Quinpirole, no significativo,  $n=8$ , **Figura 5F**. Cambio en el CPP: Control =  $1.17 \pm 0.11$ , Quinpirole =  $1.35 \pm 0.13$ . Quinpirole + DSI =  $1.15 \pm 0.1$  y Quinpirole + DSI vs Control:  $p<0.05$ ,  $n = 8$ , **Figura 5G**).

#### **8.1.5. La activación de receptores CB1 en presencia de PTX incrementa la liberación de GABA en terminales estriado-palidales por un cambio de acople de proteínas $G_i$ a $G_s$ y estimulación de la PKA.**

Los experimentos neuroquímicos sugieren que el uso de la toxina pertussis (PTX) evidencia el acople a proteínas  $G_s$  del receptor CB1 ([Glass y Felder. 1997](#) y [Gonzalez., et al. 2009](#)). Decidimos entonces examinar esta propuesta, para ello tratamos a las rebanadas con la toxina pertussis (PTX) y realizamos experimentos de electrofisiología midiendo las CPIe producidas por el par de pulsos. Debido a que el periodo de incubación con PTX es prolongado, inicialmente realizamos los experimentos control para demostrar que las células

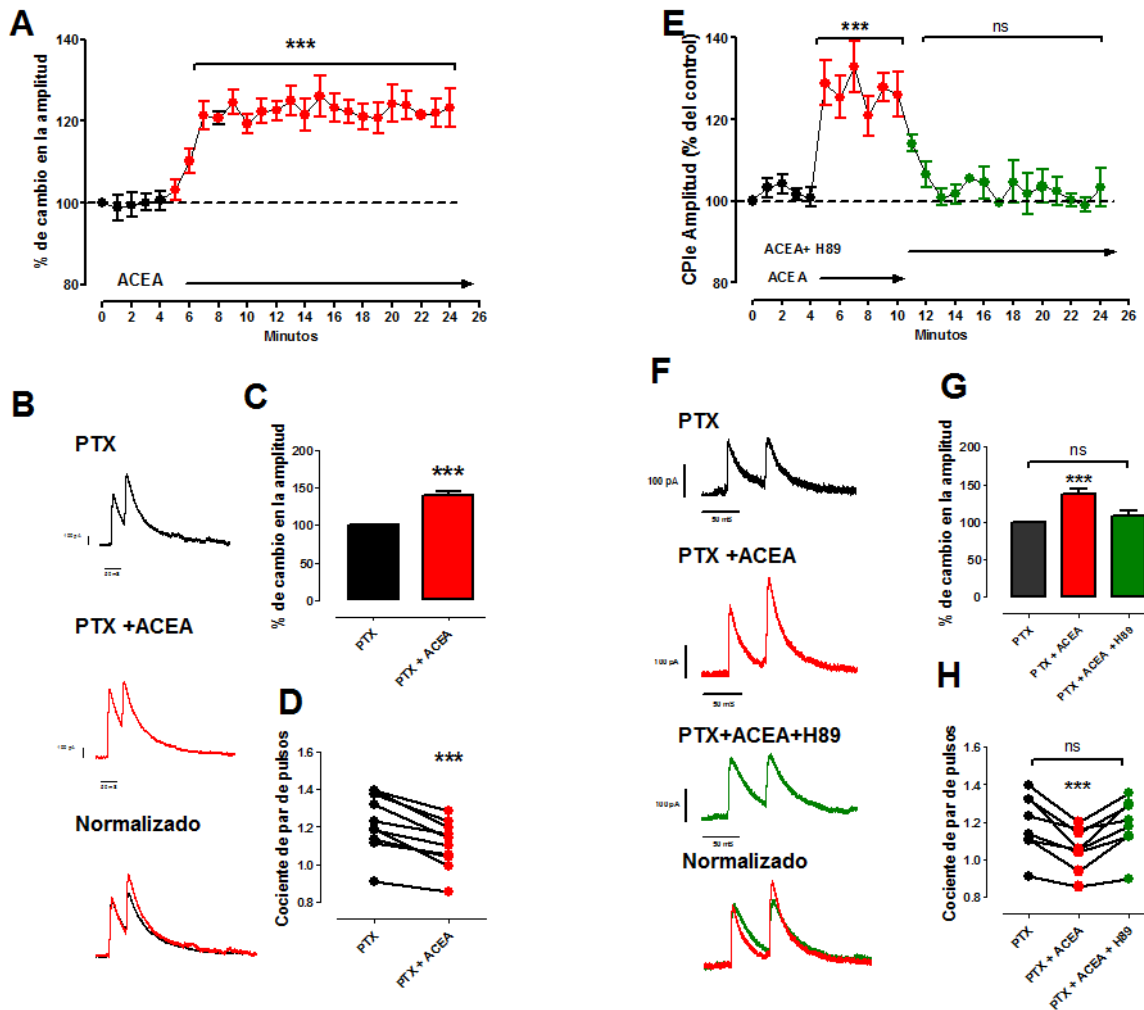
se encontraban en buen estado y viables para el registro. Caracterizamos las neuronas del GPe y se compararon con las características reportadas previamente en este trabajo en la sección anterior. En la **Figura 6**, se muestran los trazos representativos de las neuronas sometidas al tratamiento prolongado con PTX donde se puede comprobar que no hubo diferencias en las propiedades electrofisiológicas de las neuronas en esta condición.



**Figura 6.** Caracterización electrofisiológica de las neuronas del GP después del tratamiento con PTX. Muestra los trazos de la modificación en el voltage por inyección de pulsos hiperpolarizantes y despolarizantes de corriente de 300 ms de duración a intervalos de 25 pA con 5 s de diferencia entre cada pulso. Potenciales de membrana de entre 50 y 60 mV. (A) muestra los trazos representativos de tres neuronas control y (B) trazos representativos de la

*caracterización de las neuronas después de la incubación con PTX (5 µg/mL de 12 a 18 hr). La incubación con PTX no afecta la viabilidad de las neuronas de registro.*

Una vez que se comprobó la viabilidad de las neuronas del GPe después del tratamiento con PTX se realizaron los registros de las CPIe por la técnica del par de pulsos. El agonista canabinoide ACEA (Figura 7A) incrementó la amplitud de las CPIe (control PTX = 100% vs PTX+ACEA = 139±5%,  $p < 0.001$ ,  $n=10$  t test, Figura 7C) y disminuyó el CPP (Control PTX = 1.23 ± 0.05 vs PTX + ACEA 1.01 ± 0.04,  $p < 0.001$ ,  $n = 10$ , t test, Figuras 7B y 7D). Para ver si este efecto era mediado por actividad de la PKA, se utilizó al H-89 (10µM) (Figura 7E) encontrando que se revertía el efecto estimulador del ACEA en la amplitud y la disminución en el cociente del par de pulsos (Cambios en la amplitud: control = 100% vs PTX + ACEA = 137 ± 6%,  $p < 0.001$ : PTX + ACEA + H89 = 108±6% sin cambios significativos respecto del Control,  $n=8$ . Figura 7G). La disminución del CPP indica que el efecto del ACEA es a nivel pre-sináptico (Control = 100%; PTX = 1.20 ± 0.05, PTX + ACEA = 1.06 ± 0.04, PTX + ACEA + H89 = 1.19 ± 0.05; PTX+ ACEA + H89:  $p < 0.001$  vs PTX + ACEA y no significativo respecto al Control PTX,  $n = 8$ . Figuras 7F y 7H).

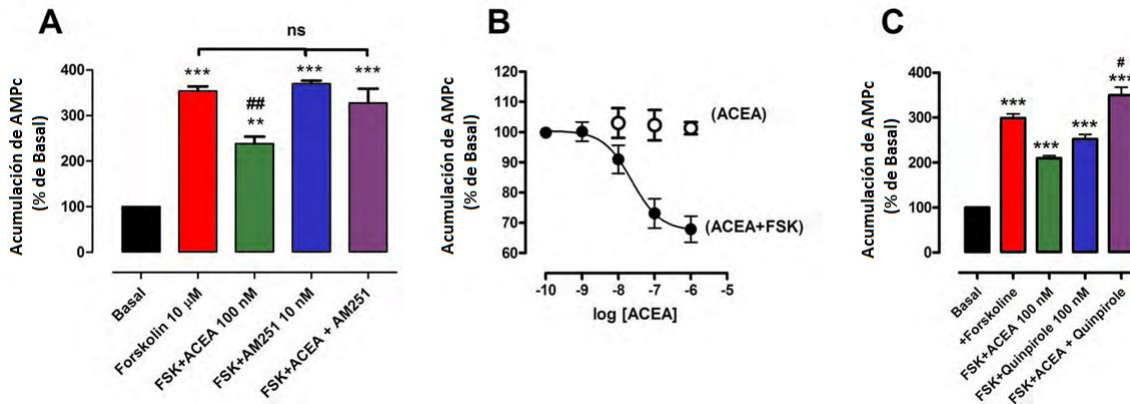


**Figura 7.** En las rebanadas de GPe pre-tratadas con PTX el ACEA aumentó la amplitud de las CPIe. (A) y (C) muestran el efecto estimulador del ACEA sobre las CPIe. Efecto que fue bloqueado por el H-89 (10 $\mu$ M) (E) y (G). (B) y (F) muestran los trazos representativos de las corrientes de GABA evocadas por el par de pulsos en el estriado y registradas en neuronas del GPe. Las CPIe se normalizaron con respecto del trazo control, para (B) PTX comparado con PTX + ACEA (1  $\mu$ M); y para (F) PTX + ACEA comparado con PTX + ACEA + H-89. (D) y (H) resumen los resultados obtenidos de los experimentos independientes sobre el CPP (n=8) un efecto que se bloquea por H-89. (\*\*\*) $p < 0.001$  diferencia significativa con respecto del control y ns, sin

*diferencia significativa, ANOVA seguida de una prueba de Tukey, media  $\pm$  error estándar).*

## **8.2. La co-activación de los receptores CB1 y D2 estimula la formación de AMPc en sinaptosomas de GP.**

El bloqueo de la liberación de GABA provocada por la co-activación de los receptores CB1 y D2; con el inhibidor de la PKA el H-89 así como el efecto estimulador de ACEA cuando las proteínas  $G_i$  se encuentran bloqueadas, sugiere que esta respuesta es mediada por la estimulación de la vía de señalización AC-AMPc-PKA. Por lo tanto realizamos experimentos para determinar si esta co-activación tiene un efecto similar sobre la acumulación de AMPc en sinaptosomas de GPe. La incubación de los sinaptosomas con ACEA (1  $\mu$ M) inhibe la formación de AMPc estimulada por el activador de la AC, Forskolina (10  $\mu$ M); un efecto que es dependiente de la dosis (**Figura 8A y 8B**,  $IC_{50} = 23$  nM, IC = de 5 a 103 nM). La inhibición de la formación de AMPc provocada por el ACEA se previene por el antagonista selectivo del receptor CB1 el AM251 (100 nM). (**Figura 8A**, Forskolina =  $353 \pm 10\%$  por arriba del Control, Forskolina + ACEA  $238 \pm 15\%$ , Forskolina + ACEA + AM-251 =  $327 \pm 31\%$ ; Forskolina + ACEA vs Forskolina solo  $P < 0.01$ , n = 3, 4 réplicas por experimento). En la **figura 8C**, se muestra que el Quinpirole también inhibe la formación de AMPc estimulada por Forskolina (Forskolina =  $299 \pm 10\%$ , Forskolina + Quinpirole =  $252 \pm 9\%$ ;  $p < 0.05$ , n = 3. 4 réplicas por serie experimental). Sin embargo, cuando se administra el Quinpirole y el ACEA simultáneamente, los niveles de AMPc incrementan por encima de la activación con Forskolina (Forskolina =  $299 \pm 10\%$ , Forskolina + Quinpirole + ACEA =  $350 \pm 17\%$ ;  $p < 0.05$ , n = 3. 4 réplicas por serie experimental).



**Figura 8.** La activación de los receptores CB1 y D2 por separado, inhibe la formación de AMPc estimulada por la Forskolina; mientras que la activación simultanea de estos receptores la estimula. (A) muestra que el ACEA (1  $\mu$ M) inhibe la formación de AMPc estimulada por la Forskolina (10  $\mu$ M), este efecto se previene por el antagonista del receptor CB1, AM251 (100 nM). (B) ilustra la curva dosis-respuesta del ACEA sobre la formación de AMPc estimulado por Forskolina en sinaptosomas de GPe. El ACEA por si solo, no tiene efecto sobre la formación de AMPc (círculos vacíos) y ACEA+Forskolina (círculos llenos). ( $IC_{50}$  = ACEA 23 nM, CI= de 5 a 103 nM). (C) El Quinpirole (1  $\mu$ M), inhibe la formación de AMPc estimulada por Forskolina (10  $\mu$ M) y también revierte la inhibición producida por el ACEA (1 $\mu$ M) sobre la formación de AMPc estimulada por Forskolina. La figura muestra las medias  $\pm$  el error estándar de la acumulación porcentual de AMPc, experimento n=3. 4 réplicas por experimento. (\*\*\*) $p$ <0.001 respecto de la condición basal, # $p$ <0.05 y ## $p$ <0.01 respecto de forskolina)

## 9. Discusión.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que: 1) La transmisión GABAérgica estriado-palidal se regula de manera inhibitoria por la activación de los receptores CB1 con agonistas canabinoides sintéticos y/o endocannabinoides. 2) La inhibición de la liberación de GABA se vuelve estimuladora por la co-activación del receptor CB1 y el receptor a dopamina D2. 3) El efecto estimulador sobre la liberación de GABA durante la co-activación de los receptores CB1-D2 se mimetiza cuando la disponibilidad de proteínas  $G_i$  activables se bloquean con PTX y 4) el aumento en la liberación de GABA ocurre mediante la activación de la vía AC-AMPC-PKA.

### 9.1. Estimulación de la liberación de GABA por co-activación CB1-D2.

El efecto estimulador de la liberación de GABA en las terminales estriado-palidales que observamos por la co-activación de los receptores CB1 y D2 en este trabajo, prueba lo que se sugiere en algunas publicaciones anteriores de nuestro grupo ([Munoz-Arenas., et al. 2015](#) y [Gonzalez., et al. 2009](#)), donde también se menciona que esta interacción tiene un papel importante sobre la modulación de la transmisión sináptica estriado-palidal.

En este trabajo mostramos que el efecto inhibitorio del ACEA sobre la amplitud de las CPIe y el incremento en el CPP se previene por el antagonista del receptor CB1, el AM251 ([Figura 2](#)). Este es un resultado que coincide con lo reportado por Engler y colaboradores en el 2006 en experimentos realizados con distintos agonistas canabinoides. De igual manera observamos que el agonista dopaminérgico de los receptores D2, el Quinpirole por si solo tiene un efecto similar sobre las CPIe y el CPP, este hecho también se ha reportado ([Cooper y Stanford 2000](#); [Shin., et al. 2003](#) y [Miguel., et al. 2012](#)). Sin embargo, de manera interesante al co-activar a los receptores CB1 y D2 se observó un aumento en la amplitud de las CPIe que correlaciona con una disminución en el CPP, lo cual sugiere una respuesta estimuladora en la liberación del neurotransmisor ([Zucker., 1989](#); [Misner y Sullivan 1999](#)). Este



efecto estimulador concuerda con los experimentos de liberación de GABA radioactivo por despolarización con potasio en las rebanadas de globo pálido (Gonzalez et al 2009, Muñoz-Arenas., et al. 2016). No obstante, el uso de técnicas electrofisiológicas nos permite evidenciar algunos aspectos del fenómeno que los experimentos neuroquímicos no. Por ejemplo, la técnica del par de pulsos nos permite evaluar solamente la liberación de GABA proveniente de las neuronas estriado-palidales que expresan selectivamente a los receptores D2 y las separa de las pálido-palidales recurrentes que expresan a los receptores D4 (Miguel., et al. 2012), lo que indica que el fenómeno de la co-activación se observa por la interacción entre los receptores CB1-D2 de estas terminales. De hecho, el efecto inhibitorio del Quinpirole sobre la liberación de GABA de estas terminales se previene por el bloqueador no selectivo de los receptores D2-like, el l-sulpiride pero no por el L-745,870, un bloqueador altamente selectivo de los receptores D4 (datos nuestros no mostrados). Por otro lado, la estimulación selectiva de la vía estriado-palidal no involucra la estimulación de la salida de dopamina endógena que si ocurre en los experimentos neuroquímicos que despolarizan de manera masiva la preparación.

En este abordaje electrofisiológico de la co-activación CB1-D2 sobre la liberación de GABA encontramos que se previene por el antagonista selectivo de los receptores CB1 el AM251, lo que refuerza la idea de que este receptor modula esta respuesta estimuladora como previamente se ha sugerido (Glass y Felder. 1997 y Gonzalez., et al. 2009) y también indican que se requiere la co-activación de ambos receptores para ver la respuesta. No obstante existen reportes en sistemas de expresión heteróloga que sugieren que la sola presencia del receptor D2, sin necesidad de la activación de estos, hace que el receptor CB1 produzca respuestas estimuladoras como lo es la estimulación de la formación de AMPc. Al respecto podemos decir que la respuesta estudiada en este trabajo indica que es necesaria la co-activación para observar los efectos funcionales, tal vez las diferencias entre las preparaciones utilizadas y/o la posible actividad constitutiva de los receptores D2 en el sistema de expresión

heteróloga puedan explicar estas observaciones. Sin embargo, la función más importante de los receptores CB1 en el sistema nervioso central es modular la liberación de neurotransmisores, en este caso sobre la transmisión sináptica GABAérgica que es indispensable para la actividad del núcleo y el control motor.

De acuerdo a la literatura, existen dos mecanismos para explicar los efectos estimulatorios de la co-activación del par de receptores. Uno de ellos propone que durante la co-activación de los receptores CB1-D2, los receptores D2 usan las proteínas  $G_i$  disponibles en el sistema, provocando una baja disponibilidad de las mismas para el acople de los receptores CB1, en esta condición el receptor CB1 se acopla a las proteínas  $G_s$  estimulando la liberación de GABA. Esta hipótesis tiene al menos dos implicaciones importantes, la primera es que los receptores D2 deberían tener más afinidad por las proteínas  $G_i$  que los CB1. En relación con esto, algunos datos sugieren que los receptores CB1 de las diversas regiones cerebrales tienen diferente afinidad por las proteínas  $G_i$ , de hecho los receptores palidales parecen ser los menos afines a estas proteínas (Sim., et al. 1996). Sin embargo, se desconoce la afinidad de los receptores D2 presentes en el pálido, lo que imposibilita una correcta comparación. La segunda es que el receptor CB1 que es el que cambiaría de acople debido a la escasez de proteínas  $G_i$  disponibles, debe de tener la capacidad de acoplarse a las proteínas  $G_s$  esto se ha reportado previamente (Glass y Felder. 1997; Chen et al. 2010).

El segundo mecanismo es el de la formación de un heterodímero entre ambos receptores, cuya actividad estimula la liberación de GABA. La heteromerización ha sido propuesta por varios autores y mostrada en sistemas de expresión heteróloga (Kearn., et al. 2005; Marcellino., et al. 2008; Przybyla y Watts 2010; Khan y Lee 2014). En nuestros experimentos no podemos descartar la posible formación de un heterodímero CB1-D2, de existir en nuestro sistema las propiedades de señalización del dímero serían entonces diferentes a las de los receptores por separado, por ejemplo: la formación del

dímero cambiaría el binding relativo de  $G_i$  a  $G_s$ , lo cual ya ha sido sugerido (Eldeeb et al., 2016). Estudios preliminares de nuestro laboratorio con la técnica de proximidad de ligandos apoyan la idea de heteromerización, sin embargo más experimentos hay que realizar para concluirlo.

Para poder determinar si la formación de un heterodímero es el responsable de la respuesta sobre la liberación de GABA en la co-activación de receptores CB1-D2, se podrían realizar ensayos de proximidad de ligando apoyados por inmunofluorescencia, experimentos de coimmuno-precipitación para ambos receptores en sinaptosomas de globo pálido a concentraciones crecientes de los distintos agonistas y curvas de desplazamiento de (“binding”) unión de ligando radioactivo en membranas de terminales estriado-palidales, sin embargo cabe mencionar que todas tienen sus desventajas y ventajas, pero en conjunto aportan una buena aproximación para aclarar el punto.

## **9.2. El efecto en estimulación de la liberación de GABA por co-activación de receptores CB1-D2 es mimetizado por endocannabinoides.**

Mostrar que el efecto de la co-activación de receptores CB1-D2 ocurre por endocannabinoides es importante ya que los estudios neuroquímicos han usado agonistas sintéticos y pudiera tratarse de un fenómeno meramente farmacológico, por ello diseñamos experimentos en los que evocamos la síntesis y liberación de endocannabinoides por la técnica del DSI.

Llano y colaboradores (1991) descubrieron que al aplicar pulsos despolarizantes en las neuronas post-sinápticas hay un decremento en las corrientes post-sinápticas espontáneas, proponiendo que este efecto inhibitorio es a nivel pre-sináptico. Estos autores plantearon que la despolarización provoca un aumento en los niveles de calcio intracelular a nivel post-sináptico, lo cual provoca la liberación de un mensajero difusible que induce inhibición de manera retrógrada en las terminales pre-sinápticas. Estudios más recientes señalan que la depresión de la transmisión inducida por despolarización es mediada por endocannabinoides provenientes de las neuronas post-sinápticas

debido al bloqueo de la respuesta por antagonistas canabinoides selectivos (Wilson y Nicoll 2002; Freund., et al. 2003; Diana y Marty 2004). En condiciones experimentales donde se induce el DSI se observa una depresión en la transmisión sináptica momentánea por un periodo de segundos después de dar el pulso despolarizante (Chevaleyre y Castillo 2003; Engler., et al. 2006). Sin embargo Yanovsky y colaboradores en el 2003 encontraron una respuesta más prolongada del DSI de hasta minutos, inducida por una larga despolarización y una baja concentración de quelante de calcio EGTA (0.2 mM) en la solución interna de registro. En la búsqueda de respuestas claras en el uso del DSI para evocar la síntesis y liberación de endocannabinoides utilizamos un protocolo similar al de estos autores (Figura 5). El bloqueo del DSI por antagonistas canabinoides (Engler., et al. 2006) es uno de los mayores argumentos que indica que dicha respuesta es mediada por la liberación de endocannabinoides (Freund., et al. 2003; Szabo y Schlicker 2005; Lovinger. 2008). El reproducir este efecto en nuestros experimentos al usar AM251 (Figuras 4 y 5) indica que un DSI prolongado como el que produjimos es dependiente de la activación receptor CB1.

Bajo estas condiciones, en las rebanadas tratadas previamente con Quinpirole, el DSI incrementó la amplitud de las CPIe y decremento el CPP convirtiendo la inhibición en una estimulación de la liberación de GABA similar a como ocurre en los experimentos donde usamos el agonista de los receptores CB1 el ACEA. El antagonista selectivo AM251 abole esta respuesta estimulatoria indicando que el efecto es mediado por el receptor CB1. Dado que la síntesis de endocannabinoides es un efecto controlado por la concentración del  $Ca^{2+}$  durante el DSI, probamos aumentar la concentración de EGTA a 5 mM en la pipeta de registro con la idea de disminuir la disponibilidad del ión y evitar la síntesis de endocanabinoide. Como era de esperarse la estimulación de la liberación de GABA no se observó en la co-activación con receptores D2 (Figura 5). Realizamos esta maniobra debido a que existen diferencias en la literatura sobre la magnitud y temporalidad de los efectos de los endocannabinoides que pueden ser explicadas por los diferentes arreglos experimentales.

### **9.3. Cambio de Acople del receptor CB1 de proteínas $G_i$ a $G_s$ y activación de la vía AC-AMPC-PKA.**

Uno de los mecanismos para explicar el efecto de la co-activación de los receptores CB1-D2, es como mencionamos, el cambio de acople a proteínas  $G_s$  y en consecuencia activación de la vía AC-AMPC-PKA.

Para evidenciar este cambio de acople y activación de la vía especificada realizamos diversas maniobras experimentales. Primero bloqueamos las proteínas  $G_i$  con toxina pertusis, esta maniobra se ha sugerido desenmascara el acople, pues obliga al receptor CB1 a usar proteínas  $G_s$  (Glass y Felder. 1997; Bonhaus et al., 1998; Bash et al., 2003). El uso de la toxina provoco un efecto claramente estimulador al activar al receptor CB1 con ACEA y de manera interesante se previno con el uso del bloqueador de la PKA, el H-89. Esto indica el acople a proteínas  $G_s$ , activación de la adenilato ciclasa y producción de AMPC, ya que esta es la vía clásica de activación de esta cinasa (Recillas-Morales., et al. 2014; Arias-Montano., et al. 2007). Cabe mencionar que se ha observado que el DSI puede ser abolido pero no revertido en neuronas piramidales de hipocampo con el pretratamiento con PTX. (Azad., et al. 2003; Pitler y Alger 1994). Esto es contrario a lo que encontramos y se puede explicar porque probablemente hay una baja disponibilidad de proteínas  $G_s$  cercanas al dominio celular donde se activan los receptores. Las diferencias en los hallazgos entre diferentes áreas cerebrales (globo pálido vs hipocampo) pueden ser causadas por las diferentes distribuciones regionales de componentes moleculares involucrados en cada paso de la cascada de señalización.

La participación de la vía AC-AMPC-PKA en la co-activación CB1-D2 también se demuestra en los resultados donde se administraron los agonistas sintéticos, efecto prevenido también por el H-89, y finalmente en los experimentos de acumulación de AMPC. El aumento de este segundo mensajero en la terminal se ha relacionado también con el aumento en la liberación de GABA a través de la

fosforilación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje por acción de la PKA (Arias-Montano., et al. 2007; Shindou., et al. 2002; Neve., et al. 2004; Nava-Asbell., et al. 2007 y Recillas-Morales., et al. 2014). La participación de otras vías de señalización asociadas a la estimulación de la liberación de GABA tras activación de otros pares de receptores en el globo pálido ( $\text{A}_{2\text{A}}$ -D2, CB1- $\mu$ ) como la  $\beta\gamma$ -PLC ó Gq-PLC se han descartado en estudios neuroquímicos realizados en nuestro laboratorio (datos no mostrados).

#### **9.4. Relevancia fisiológica.**

Previamente hemos reportado que la inyección de ACEA directamente en el globo pálido de manera unilateral no modifica la conducta motora de animales de experimentación, sin embargo cuando los animales son tratados con anfetamina, el efecto de la activación del receptor CB1 produce un intenso giro ipsilateral (Munoz-Arenas., et al. 2015, Caballero-Floran., et al. 2016). Estos datos indican que se requiere la activación del sistema dopaminérgico para que los ligandos del receptor CB1 modifiquen la conducta motora, lo cual no es una condición única de los receptores CB1 los receptores  $\text{A}_1$  y  $\text{A}_{2\text{A}}$  también la requieren (Jiang., et al. 1993; Popoli., et al. 1994 y 1996; Floran., et al. 2002). De manera interesante el bloqueo de los receptores D2 palidales previene esta respuesta (Munoz-Arenas., et al. 2015, Caballero-Floran., et al. 2016). La necesaria co-activación de los receptores CB1-D2 para modificar la expresión de la conducta motora podría ser perfectamente explicada por el mecanismo celular evidenciado por nuestros resultados. Es decir durante la co-activación de receptores CB1 (ACEA intrapalidal) y D2 (anfetamina), se producirá un incremento en la liberación de GABA localmente, este aumento de acuerdo al circuito de los ganglios basales provocaría inhibición de las neuronas palidales, lo que a su vez aumentaría la actividad de las neuronas subtalámicas que estimularía los núcleos de salida y a su vez inhibirían al tálamo, lo cual disminuye la actividad de la corteza motora. Como la manipulación es unilateral, se produce un desbalance motor que se manifiesta como conducta de

giro. Esto sugiere una participación de ambos receptores en el control motor de manera co-participativa.

El efecto del canabinoide opuesto al clásicamente descrito en la transmisión sináptica lleva al planteamiento de varias cuestiones de relevancia fisiológica. Como por ejemplo el saber ¿Qué condiciones podría aumentar la síntesis y liberación de endocannabinoides en el GPe? La activación de receptores a glutamato de tipo inotrópico o acoplados a proteínas G ubicados en la neurona post-sináptica y una alta actividad de estimulación ortodrómica induce la liberación de endocannabinoides (Brown., et al. 2003), así que la estimulación de terminales glutamatérgicas provenientes del NST (Van Der Kooy y Hattori 1980) podrían ser las responsables de incrementar la liberación de endocannabinoides por las neuronas palidales. Proyecciones del núcleo subtalámico también pueden ser responsables de estimular la liberación de dopamina proveniente de la SNc al GPe (Iribe., et al. 1999). Por tanto el aumento de la dopamina disponible en el espacio sináptico y la presencia de endocanabinoide favorecería el aumento en la liberación de GABA. Tal efecto modularía la actividad de las neuronas palidales y por ende la actividad motora. De esta manera existiría un control dopamino-canabinoidinérgico en el control de la transmisión estriato-palidal regido por el subtálamo altamente importante para el control motor.

## **10. Conclusiones.**

- **La co-activación de los receptores CB1-D2 en el globo pálido estimula la liberación de GABA a través de la vía AC-AMPC-PKA**
- **El efecto ocurre en las terminales de vía estriado-palidal**
- **El efecto requiere de un cambio de acople de proteínas Gi a proteínas Gs por parte de los receptores CB1**
- **La activación de los receptores CB1 por endocannabinoides también reproduce el efecto.**
- **Este efecto parece ser importante para el control de la actividad motora mediada por el Globo Pálido.**



## 11. Referencias.

- Aceves, J. J., et al. (2011). "Bidirectional plasticity in striatonigral synapses: a switch to balance direct and indirect basal ganglia pathways." *Learn Mem* 18(12): 764-773.
- Acosta-Garcia, J., et al. (2009). "D4 and D1 dopamine receptors modulate [3H] GABA release in the substantia nigra pars reticulata of the rat." *Neuropharmacology* 57(7-8): 725-730.
- Arias-Montano, J. A., et al. (2007). "Dopamine D(1) receptor facilitation of depolarization-induced release of gamma-amino-butyric acid in rat striatum is mediated by the cAMP/PKA pathway and involves P/Q-type calcium channels." *Synapse* 61(5): 310-319.
- Avalos-Fuentes, A., et al. (2013). "Presynaptic CaMKIIalpha modulates dopamine D3 receptor activation in striatonigral terminals of the rat brain in a Ca(2)(+) dependent manner." *Neuropharmacology* 71: 273-281.
- Azad, S. C., et al. (2003). "Activation of the cannabinoid receptor type 1 decreases glutamatergic and GABAergic synaptic transmission in the lateral amygdala of the mouse." *Learn Mem* 10(2): 116-128.
- Bash, R., ET AL. (2003). "The stimulatory effect of cannabinoids on calcium uptake is mediated by Gs GTP-binding proteins and cAMP formation". *Neurosignals* 12:39-44.
- Beaulieu, J. M. and R. R. Gainetdinov (2011). "The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors." *Pharmacol Rev* 63(1): 182-217.
- Bidaut-Russell, M., et al. (1990). "Cannabinoid receptors and modulation of cyclic AMP accumulation in the rat brain." *J Neurochem* 55(1): 21-26.
- Bonhaus, D. W., et al. (1998)." Dual Activation and Inhibition of Adenylyl Cyclase by Cannabinoid Receptor Agonists: Evidence for

Agonist-Specific Trafficking of Intracellular Responses” *J Pharmacol Exp Ther* 287: 884–888.

- Brown, S. P., et al. (2003). "Brief presynaptic bursts evoke synapse-specific retrograde inhibition mediated by endogenous cannabinoids." *Nat Neurosci* 6(10): 1048-1057.
- Caballero-Florán, R., et al. (2011). "Coactivation of CB1 cannabinoid and  $\mu$  opioid receptors enhances GABA release in the external globus pallidus (GPe) via activation of PLC and protein kinase C (PKC)". 41st Annual Meeting of the Society of Neuroscience, Washington, DC. U.S.A., November 2011.
- Caballero-Florán, R., et al. (2016). "Cannabinoid-induced depression of synaptic transmission is switched to stimulation when dopaminergic tone is increased in the globus pallidus of the rodent". *Neuropharmacology* 110 (2016) 407-418.
- Chen, X. P., et al. (2010) "Structural determinants in the second intracellular loop of the human cannabinoid CB1 receptor mediate selective coupling to Gs and Gi. *British Journal of Pharmacology* (2010) 161 1817–1834 1817.
- Chevaleyre, V. and P. E. Castillo (2003). "Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: a novel role of endocannabinoids in regulating excitability." *Neuron* 38(3): 461-472.
- Christopher S. Kearn (2004). "Immunofluorescent Mapping of Cannabinoid CB1 and Dopamine D2 Receptors in the Mouse Brain." Published October, 2004 by LI-COR Biosciences. [www.licor.com](http://www.licor.com).
- Cooper, A. J. and I. M. Stanford (2000). "Electrophysiological and morphological characteristics of three subtypes of rat globus pallidus neurone in vitro." *J Physiol* 527 Pt 2: 291-304.
- Cruz-Trujillo, R., et al. (2013). "D3 dopamine receptors interact with dopamine D1 but not D4 receptors in the GABAergic terminals of the SNr of the rat." *Neuropharmacology* 67: 370-378.

- Davies M. A., et al. (2000) "Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors" *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 318(2), 589-595.
- Demuth, D. G. and A. Molleman (2006). "Cannabinoid signalling." *Life Sci* 78(6): 549-563.
- Di Marzo, V. (2011). "Endocannabinoid signaling in the brain: biosynthetic mechanisms in the limelight." *Nat Neurosci* 14(1): 9-15.
- Di Marzo, V., et al. (2004). "The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation." *Nat Rev Drug Discov* 3(9): 771-784.
- Diana, M. A. and A. Marty (2004). "Endocannabinoid-mediated short-term synaptic plasticity: depolarization-induced suppression of inhibition (DSI) and depolarization-induced suppression of excitation (DSE)." *Br J Pharmacol* 142(1): 9-19.
- Engler, B., et al. (2006). "Effects of exogenous and endogenous cannabinoids on GABAergic neurotransmission between the caudate-putamen and the globus pallidus in the mouse." *J Pharmacol Exp Ther* 316(2): 608-617.
- Ferrada, C., et al. (2009). "Marked changes in signal transduction upon heteromerization of dopamine D1 and histamine H3 receptors." *Br J Pharmacol* 157(1): 64-75.
- Ferre, S., et al. (2008). "An update on adenosine A2A-dopamine D2 receptor interactions: implications for the function of G protein-coupled receptors." *Curr Pharm Des* 14(15): 1468-1474.
- Floran, B., et al. (1990). "Activation of D1 dopamine receptors stimulates the release of GABA in the basal ganglia of the rat." *Neurosci Lett* 116(1-2): 136-140.
- Floran, B., et al. (2002). "Adenosine A1 receptors control dopamine D1-dependent [(3)H]GABA release in slices of substantia nigra pars reticulata and motor behavior in the rat." *Neuroscience* 115(3): 743-751.

- Floran, B., et al. (2005). "Interactions between adenosine A(2a) and dopamine D2 receptors in the control of [(3)H]GABA release in the globus pallidus of the rat." *Eur J Pharmacol* 520(1-3): 43-50.
- Freund, T. F., et al. (2003). "Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling." *Physiol Rev* 83(3): 1017-1066.
- Gerfen, C. R., et al. (1990). "D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons." *Science* 250(4986): 1429-1432.
- Glass, M. and C. C. Felder (1997). "Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor." *J Neurosci* 17(14): 5327-5333.
- Glass, M., et al. (2000). "The pattern of neurodegeneration in Huntington's disease: a comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and GABA(A) receptor alterations in the human basal ganglia in Huntington's disease." *Neuroscience* 97(3): 505-519.
- Gonzalez, B., et al. (2009). "Cannabinoid agonists stimulate [3H]GABA release in the globus pallidus of the rat when G(i) protein-receptor coupling is restricted: role of dopamine D2 receptors." *J Pharmacol Exp Ther* 328(3): 822-828.
- Herkenham, M., et al. (1990). "Cannabinoid receptor localization in brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(5): 1932-1936.
- Herkenham, M., et al. (1991). "Neuronal localization of cannabinoid receptors and second messengers in mutant mouse cerebellum." *Brain Res* 552(2): 301-310.
- Howlett, A. C. (2005). "Cannabinoid receptor signaling." *Handb Exp Pharmacol*(168): 53-79.). "Cannabinoid receptor signaling." *Handb Exp Pharmacol*(168): 53-79.
- Howlett, A. C., et al. (2002). "International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors." *Pharmacol Rev* 54(2): 161-202.

- Iribe, Y., et al. (1999). "Subthalamic stimulation-induced synaptic responses in substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons in vitro." *J Neurophysiol* 82(2): 925-933.
- Jarrahian, A., et al. (2004). "D2 dopamine receptors modulate G $\alpha$ -subunit coupling of the CB1 cannabinoid receptor." *J Pharmacol Exp Ther* 308(3): 880-886.
- Jiang, H., et al. (1993). "Adenosine receptor antagonists potentiate dopamine receptor agonist-induced rotational behavior in 6-hydroxydopamine-lesioned rats." *Brain Res* 613(2): 347-351.
- Jin, W., et al. (1994). "U73122 inhibits phospholipase C-dependent calcium mobilization in neuronal cells" *Brain Res* 642: 237-243.
- Kearn, C. S., et al. (2005). "Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors enhances heterodimer formation: a mechanism for receptor cross-talk?" *Mol Pharmacol* 67(5): 1697-1704.
- Khan, S. S. and F. J. Lee (2014). "Delineation of domains within the cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors that mediate the formation of the heterodimer complex." *J Mol Neurosci* 53(1): 10-21.
- Lovinger, D. M. (2008). "Communication networks in the brain: neurons, receptors, neurotransmitters, and alcohol." *Alcohol Res Health* 31(3): 196-214.
- Marcellino, D., et al. (2008). "Antagonistic cannabinoid CB1/dopamine D2 receptor interactions in striatal CB1/D2 heteromers. A combined neurochemical and behavioral analysis." *Neuropharmacology* 54(5): 815-823.
- Matsuda, L. A., et al. (1990). "Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA." *Nature* 346(6284): 561-564.
- Matyas, F., et al. (2006). "Subcellular localization of type 1 cannabinoid receptors in the rat basal ganglia." *Neuroscience* 137(1): 337-361.
- Miguez, C., et al. (2012). "Altered pallido-pallidal synaptic transmission leads to aberrant firing of globus pallidus neurons in a rat model of Parkinson's disease." *J Physiol* 590(22): 5861-5875.

- Misner, D. L. and J. M. Sullivan (1999). "Mechanism of cannabinoid effects on long-term potentiation and depression in hippocampal CA1 neurons." *J Neurosci* 19(16): 6795-6805.
- Missale, C., et al. (1998). "Dopamine receptors: from structure to function." *Physiol Rev* 78(1): 189-225.
- Mukhopadhyay, S., et al. (2002). "CB(1) cannabinoid receptor-G protein association: a possible mechanism for differential signaling." *Chem Phys Lipids* 121(1-2): 91-109.
- Munoz-Arenas, G., et al. (2015). "Cannabinoid CB1 receptors activation and coactivation with D2 receptors modulate GABAergic neurotransmission in the globus pallidus and increase motor asymmetry." *Synapse* 69(3): 103-114.
- Nava-Asbell, C., et al. (2007). "GABA(B) receptor activation inhibits dopamine D1 receptor-mediated facilitation of [(3)H]GABA release in substantia nigra pars reticulata." *Neuropharmacology* 53(5): 631-637.
- Neve, K. A., et al. (2004). "Dopamine receptor signaling." *J Recept Signal Transduct Res* 24(3): 165-205.
- Nishi, A., et al. (2011). "Mechanisms for the modulation of dopamine d(1) receptor signaling in striatal neurons." *Front Neuroanat* 5: 43.
- Obeso, J. A. and J. L. Lanciego (2011). "Past, present, and future of the pathophysiological model of the Basal Ganglia." *Front Neuroanat* 5: 39.
- Obeso, J. A., et al. (2002). "The basal ganglia and disorders of movement: pathophysiological mechanisms." *News Physiol Sci* 17: 51-55.
- Obeso, J. A., et al. (2008). "Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease." *Mov Disord* 23 Suppl 3: S548-559.
- Paz-Bermúdez F., et al. (2010). A2A and CB1 receptors modulate GABA release by stimulating the formation of cAMP in the Globus Pallidus of the rat. LIII National Congress of Physiological Sciences. Villahermosa, Tab.

- Piomelli, D., et al. (2000). "The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs." *Trends Pharmacol Sci* 21(6): 218-224.
- Pisani, V., et al. (2011). "Homeostatic changes of the endocannabinoid system in Parkinson's disease." *Mov Disord* 26(2): 216-222.
- Pitler, T. A. and B. E. Alger (1994). "Depolarization-induced suppression of GABAergic inhibition in rat hippocampal pyramidal cells: G protein involvement in a presynaptic mechanism." *Neuron* 13(6): 1447-1455.
- Popoli, P., et al. (1994). "Modulation of striatal adenosine A1 and A2 receptors induces rotational behaviour in response to dopaminergic stimulation in intact rats." *Eur J Pharmacol* 257(1-2): 21-25.
- Popoli, P., et al. (1996). "Adenosine A1 receptor blockade selectively potentiates the motor effects induced by dopamine D1 receptor stimulation in rodents." *Neurosci Lett* 218(3): 209-213.
- Przybyla, J. A. and V. J. Watts (2010). "Ligand-induced regulation and localization of cannabinoid CB1 and dopamine D2L receptor heterodimers." *J Pharmacol Exp Ther* 332(3): 710-719.
- Rashid, A. J., et al. (2007). "D1-D2 dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(2): 654-659.
- Recillas-Morales, S., et al. (2014). "L-type Ca(2)(+) channel activity determines modulation of GABA release by dopamine in the substantia nigra reticulata and the globus pallidus of the rat." *Neuroscience* 256: 292-301.
- Rommelfanger, K. S. and T. Wichmann (2010). "Extra-striatal dopaminergic circuits of the Basal Ganglia." *Front Neuroanat* 4: 139.
- Schlicker, E. and M. Kathmann (2001). "Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors." *Trends Pharmacol Sci* 22(11): 565-572.

- Shin, R. M., et al. (2003). "Dopamine D4 receptor-induced postsynaptic inhibition of GABAergic currents in mouse globus pallidus neurons." *J Neurosci* 23(37): 11662-11672.
- Shindou, T., et al. (2002). "Presynaptic adenosine A2A receptors enhance GABAergic synaptic transmission via a cyclic AMP dependent mechanism in the rat globus pallidus." *Br J Pharmacol* 136(2): 296-302.
- Stanford, I. M. and A. J. Cooper (1999). "Presynaptic mu and delta opioid receptor modulation of GABA<sub>A</sub> IPSCs in the rat globus pallidus in vitro." *J Neurosci* 19(12): 4796-4803.
- Szabo, B. and E. Schlicker (2005). "Effects of cannabinoids on neurotransmission." *Handb Exp Pharmacol*(168): 327-365.
- Van Der Kooy, D. and T. Hattori (1980). "Single subthalamic nucleus neurons project to both the globus pallidus and substantia nigra in rat." *J Comp Neurol* 192(4): 751-768.
- Venderova, K., et al. (2005). "Differential effects of endocannabinoids on [<sup>3</sup>H]-GABA uptake in the rat globus pallidus." *Exp Neurol* 194(1): 284-287.
- Walsh, S., et al. (2010). "The effects of cannabinoid drugs on abnormal involuntary movements in dyskinetic and non-dyskinetic 6-hydroxydopamine lesioned rats." *Brain Res* 1363: 40-48.
- Wilson, R. I. and R. A. Nicoll (2002). "Endocannabinoid signaling in the brain." *Science* 296(5568): 678-682.
- Woods, A. S., et al. (2008). "How calmodulin interacts with the adenosine A(2A) and the dopamine D(2) receptors." *J Proteome Res* 7(8): 3428-3434.
- Yanovsky, Y., et al. (2003). "Retrograde signaling changes the venue of postsynaptic inhibition in rat substantia nigra." *Neuroscience* 122(2): 317-328.
- Zucker, R. S. (1989). "Short-term synaptic plasticity." *Annu Rev Neurosci* 12: 13-31.



- Shin, R. M., et al. (2003). "Dopamine D4 receptor-induced postsynaptic inhibition of GABAergic currents in mouse globus pallidus neurons." *J Neurosci* 23(37): 11662-11672.
- Shindou, T., et al. (2002). "Presynaptic adenosine A2A receptors enhance GABAergic synaptic transmission via a cyclic AMP dependent mechanism in the rat globus pallidus." *Br J Pharmacol* 136(2): 296-302.
- Stanford, I. M. and A. J. Cooper (1999). "Presynaptic mu and delta opioid receptor modulation of GABA<sub>A</sub> IPSCs in the rat globus pallidus in vitro." *J Neurosci* 19(12): 4796-4803.
- Szabo, B. and E. Schlicker (2005). "Effects of cannabinoids on neurotransmission." *Handb Exp Pharmacol*(168): 327-365.
- Van Der Kooy, D. and T. Hattori (1980). "Single subthalamic nucleus neurons project to both the globus pallidus and substantia nigra in rat." *J Comp Neurol* 192(4): 751-768.
- Venderova, K., et al. (2005). "Differential effects of endocannabinoids on [<sup>3</sup>H]-GABA uptake in the rat globus pallidus." *Exp Neurol* 194(1): 284-287.
- Walsh, S., et al. (2010). "The effects of cannabinoid drugs on abnormal involuntary movements in dyskinetic and non-dyskinetic 6-hydroxydopamine lesioned rats." *Brain Res* 1363: 40-48.
- Wilson, R. I. and R. A. Nicoll (2002). "Endocannabinoid signaling in the brain." *Science* 296(5568): 678-682.
- Woods, A. S., et al. (2008). "How calmodulin interacts with the adenosine A(2A) and the dopamine D(2) receptors." *J Proteome Res* 7(8): 3428-3434.
- Yanovsky, Y., et al. (2003). "Retrograde signaling changes the venue of postsynaptic inhibition in rat substantia nigra." *Neuroscience* 122(2): 317-328.
- Zucker, R. S. (1989). "Short-term synaptic plasticity." *Annu Rev Neurosci* 12: 13-31.