



**Cinvestav**

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, BIOFÍSICA Y  
NEUROCIENCIAS

**“Papel de los receptores de dopamina tipo D2 sobre la liberación de  
[<sup>3</sup>H]-GABA mediada por el receptor de cannabinoides tipo 1 (CB1) en  
la Substancia Negra reticulada de la rata.”**

**T E S I S**

Que presenta

**LBM. SANDRA NAYELI CABRERA ISIDORO**

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE**

**NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

DIRECTOR DE LA TESIS:

**DR. BENJAMÍN FLORÁN GARDUÑO**

México, D.F.

Septiembre, 2015

**El presente trabajo se realizó en el laboratorio 7 de Neurociencias, del departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección del Dr. Benjamín Florán Garduño, gracias al apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) para el proyecto 152326.**

## **AGRADECIMIENTOS.**

### **A CONACyT**

Por otorgarme una beca de maestría que me permitió dedicarle tiempo completo al desarrollo de este proyecto.

### **Al personal académico del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias**

Por su contribución a mi formación profesional.

### **Al Dr. Benjamín Florán Garduño**

Por permitirme desarrollar un proyecto de investigación bajo su cargo, por su apoyo y consejos dados.

### **Al Dr. José Rodolfo Delgado Lezama, Dr. Ismael Jiménez Estrada y Dr. Jorge Aceves Ruíz**

Por el tiempo, sugerencias y comentarios realizados durante la revisión de este trabajo.

### **Al MC Rodolfo Enedino Sánchez Zavaleta**

Por toda la ayuda prestada en el desarrollo de este proyecto.

### **Al auxiliar técnico, técnicos y compañeros del laboratorio 4 y 7 de Neurociencias.**

Por el trabajo y consejos dados durante mi estancia en el laboratorio.

### **A las amistades que hice en el CINVESTAV**

Por su apoyo incondicional durante los buenos y malos momentos.

### **A mi familia**

Por su amor, comprensión, paciencia, consejos y apoyo incondicional.

# Índice

RESUMEN.....	VII
<b>I. ANTECEDENTES.....</b>	<b>9</b>
a. Los ganglios basales .....	9
b. Substancia nigra reticulada: señalización y función.....	11
c. Neurotransmisión sináptica en la SNr .....	11
i. Neurotransmisión GABAérgica.....	11
ii. Neurotransmisión dopaminérgica .....	12
d. Modulación de la transmisión sináptica por endocannabinoides .....	14
i. Receptor de cannabinoides tipo 1 (CB1): señalización y función .....	18
ii. Localización de receptores CB1 en los ganglios basales .....	22
e. Interacción de los sistemas endocanabinoide-dopaminérgico.....	25
<b>II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>28</b>
<b>III. HIPÓTESIS.....</b>	<b>29</b>
<b>IV. OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
a. Objetivo general.....	29
b. Objetivos específicos .....	29
<b>V. MATERIAL Y MÉTODO.....</b>	<b>30</b>
a. Técnica de liberación .....	30
b. Pretratamiento de las ratas con reserpina.....	31
c. Análisis de datos.....	32
d. Fármacos.....	33
<b>VI. RESULTADOS .....</b>	<b>34</b>
a. Efecto bifásico del agonista del receptor CB1 ACEA sobre la liberación de [ <sup>3</sup> H]-GABA .....	34
b. El receptor CB1 es responsable del efecto facilitador e inhibidor de la liberación de [ <sup>3</sup> H]-GABA mediado por ACEA.....	35
c. La dopamina endógena participa en el efecto facilitador de la liberación de [ <sup>3</sup> H]-GABA mediado por ACEA .....	37
d. Los receptores de dopamina de la familia D2 participan en el efecto facilitatorio de la liberación de [ <sup>3</sup> H]-GABA mediado por ACEA en la SNr de rata.....	38
e. El efecto facilitador de la liberación de [ <sup>3</sup> H]-GABA mediado por la activación del receptor CB1 requiere la activación de la PKA .....	40

<b>VII. DISCUSIÓN .....</b>	<b>42</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>47</b>
<b>IX. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>47</b>
<b>X. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>48</b>

## ABREVIATURAS

- 2-AG:** 2-araquidonilglicerol
- 3-MT:** 3-metoxitiramina
- 6-OHDA:** 6-hidroxi-dopamina
- $\Delta^9$ -THC:**  $\Delta^9$ -tetrahidrocanabinol
- AEA:** Araquidonil etanolamina, anandamida
- AIBP:** Proteínas de unión intracelular a AEA
- AMPc:** Adenosín monofosfato 3',5'-cíclico
- AVT:** Área ventral tegmental
- Cb:** Cerebelo
- CGRP:** Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
- COMT:** Catecol-O-metiltransferasa
- DAGL:** Diacilglicerol lipasa
- DAT:** Transportador de dopamina
- DOPAC:** Ácido 3,4-dihidroxifenilacético
- DSE:** Supresión de la excitación inducida por despolarización
- DSI:** Supresión de la inhibición inducida por despolarización
- EMT:** Transportador de endocannabinoides
- Ent:** Corteza entorrinal
- EP:** Núcleo entopeduncular
- ERK1/2:** Cinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2
- FAAH:** Amida hidrolasa de ácidos grasos
- GABA:** ácido  $\gamma$ -aminobutírico
- GABAT:** GABA transaminasa
- GAD:** Descarboxilasa de ácido glutámico
- GAT:** Transportador de GABA
- GPe:** Globo pálido externo
- GPI:** Globo pálido interno
- GPCR:** Receptor acoplado a proteínas G
- HSP70:** Heat shock protein 70

**ICL:** Asa intracelular  
**IPC:** Núcleo central intrapeduncular  
**LGP:** Globo pálido lateral  
**LPI:** 1- $\alpha$ -lisofosfatilinositol  
**MAGL:** Monoacilglicerol lipasa  
**MAO:** Monoamino oxidasa  
**MAPKs:** Proteína cinasa activada por mitógeno  
**MG:** Núcleo geniculado medial  
**MGP:** Globo pálido medial  
**NAPE-PLD:** Fosfolipasa D selectiva de N-acilfosfatidial-etanolamina  
**NArPE:** N-araquidonil fosfatidiletanolamina  
**NAT:** N-aciltransferasa  
**NADA:** N-araquidonildopamina  
**NST:** Núcleo subtalámico  
**PLA:** Fosfolipasa A  
**PLC:** Fosfolipasa C  
**PPAR:** Receptor activado por el factor de proliferación de peroxisomas  
**SNc:** Substancia nigra compacta  
**SNr:** Substancia nigra reticulada  
**SNC:** Sistema nervioso central  
**SNP:** Sistema nervioso periférico  
**STh:** Núcleo subtalámico  
**SuG:** Capa gris superficial del colículo superior  
**TRP:** Transient receptor potential cation channel  
**TRPV1:** Transient receptor potential vanilloid 1

## RESUMEN

El movimiento voluntario es una función regulada por un grupo de núcleos subcorticales interconectados entre sí denominados ganglios basales. De ellos, es de particular interés la sustancia nigra reticulada, un núcleo de salida que determina la generación o la inhibición del movimiento debido a que recibe e integra información de tipo GABAérgica y glutamatérgica proveniente de la vía directa e indirecta de los ganglios basales. En condiciones fisiológicas, la generación del movimiento requiere una adecuada modulación entre excitación e inhibición en la SNr y ésta modulación es mediada por la dopamina, aunque recientemente se ha encontrado que también participan los endocannabinoides. Estos compuestos endógenos son neurotransmisores retrógrados que clásicamente se les ha atribuido la función de prevenir la liberación del neurotransmisor, sin embargo, estudios realizados en cultivo primario de estriado y en rebanadas de globo pálido mostraron que los cannabinoides pueden mediar dos tipos de respuestas sobre la liberación de GABA: una que es la clásica inhibitoria y otra que facilita la liberación del neurotransmisor, y que éste efecto facilitador depende de la co-activación del receptor de cannabinoides tipo 1 (CB1) y del receptor de dopamina tipo D2, mientras que su activación individual sólo produce inhibición de la liberación de GABA. Este fenómeno hizo que nos planteáramos si este efecto podía ocurrir en la SNr, un núcleo que tiene una alta expresión de receptores CB1 y que es regulado por dopamina. Por lo tanto, en el presente trabajo se evaluó dicha hipótesis.

Los experimentos realizados en rebanadas de SNr de rata mostraron un efecto inhibitor y otro facilitador de la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA. El efecto clásico inhibitorio requirió la activación del receptor CB1 con el agonista selectivo ACEA [ $10^{-7}$ M] y [ $5 \times 10^{-7}$ M], mientras que el efecto facilitador de la liberación del neurotransmisor fue mediado por la co-activación del receptor CB1 y del receptor de dopamina D4 por [ $10^{-10}$ M] y [ $10^{-9}$ M] de ACEA y dopamina endógena, respectivamente. Finalmente, se determinó que el aumento de la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA requirió la activación de la PKA, sugiriendo la participación de la vía AC-AMPC-PKA.



## ABSTRACT

Voluntary movement is a function regulated by a group of interconnected subcortical nuclei named basal ganglia. From them, substantia nigra pars reticulata (SNr) is particularly relevant because is the output nucleus that determines the generation or inhibition of movement. It receives and integrates GABAergic and glutamatergic input from direct and indirect pathway from basal ganglia. In physiological conditions, generation of movement requires appropriated modulation between excitation and inhibition in SNr, and this modulation is mediated by dopamine, although endocannabinoid also take part. These endogenous substances are transmitters involve in retrograde signaling and it has been classically admitted that they depress transmitter release. However, there are studies carried out in primary striatal culture and globus pallidus slices that demonstrated two responses in GABA release mediated by cannabinoids: an expected inhibitory response and other that it stimulated transmitter release. This stimulating effect depends on CB1 receptor and D2-like receptor coactivation, whereas the separately activation of CB1 or D2-like receptor produces inhibition of GABA release. This finding raises the question whether this effect could happen in SNr, a nucleus with high expression of CB1 receptor and that it is modulated by dopamine. Therefore, the purpose of the present study was to ascertain this hypothesis.

The experiment performed in slices of the rat SNr demonstrated an inhibitory and stimulatory effect on [<sup>3</sup>H]-GABA release. The classic inhibitory effect requires the activation of CB1 receptor with selective agonist ACEA [ $10^{-7}$ M] and [ $5 \times 10^{-7}$ M], whereas stimulatory effect on transmitter release was mediated by CB1 receptor and D4 receptor coactivation by ACEA [ $10^{-10}$ M] and [ $10^{-9}$ M], and endogenous dopamine, respectively. Finally, it was ascertained that stimulation on [<sup>3</sup>H]-GABA release needs the activation of PKA, suggesting that AC-cAMP-PKA pathway is involved.

## **I. ANTECEDENTES**

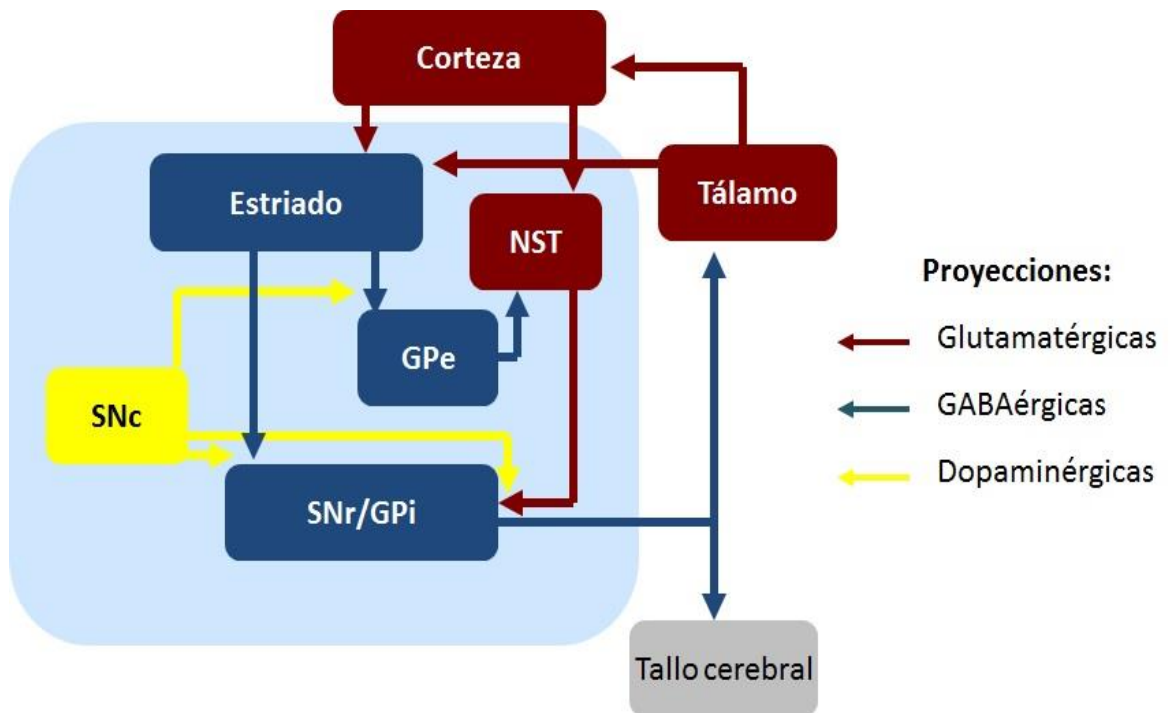
### **a. Los ganglios basales**

Los ganglios basales son núcleos cerebrales que forman parte del circuito motor y son encargados de controlar la ejecución correcta de los movimientos voluntarios. Los núcleos principales se localizan a nivel dorsal del encéfalo e incluyen al neostriado, el cual es dividido por la cápsula interna en caudado y putamen; al segmento interno (GPi) y segmento externo (GPe) del globo pálido; la sustancia nigra parte compacta (SNc) y reticulada (SNr) y al núcleo subtalámico (NST) (Figura 1). En los roedores, el neostriado comprende un solo núcleo denominado caudado-putamen, y el segmento interno del globo pálido es similar, en cuanto a conectividad, al núcleo entopeduncular (EP). A nivel ventral se localizan el núcleo accumbens y el pálido ventral (Tepper et al., 2007, Guatteo et al., 2009).

Las proyecciones estriatales, palidales y nigrales son mayoritariamente GABAérgicas, como lo mostró un análisis cuantitativo de los componentes dorsales de los ganglios basales, en donde el 98.86 % de las neuronas estudiadas fueron GABAérgicas, mientras que las neuronas restantes comprendieron aquellas glutamatérgicas del NST, las neuronas dopaminérgicas de la SNc y las interneuronas colinérgicas (Oorschot, 1996). Las neuronas espinosas medianas son el principal tipo neuronal en el neostriado, reciben aferencias glutamatérgicas desde la corteza cerebral y el tálamo, en particular del núcleo talámico intralaminar (núcleos centromediano y parafascicular). Otra aferencia importante al neostriado es la dopaminérgica, cuyos axones provienen de la SNc y del área ventral tegmental (AVT), aunque también hay liberación de dopamina desde el soma y dendritas de neuronas dopaminérgicas (Tepper et al., 2007, Rice et al., 2011).

Las proyecciones de las neuronas espinosas medianas del neostriado pueden dirigirse directamente a la SNr y al GPi (Figura 1), denominados los núcleos de salida, y forman la vía directa. Otras proyecciones pueden hacer el primer contacto con el GPe y el NST antes de llegar a los núcleos de salida, constituyendo la vía indirecta. Existe una vía más rápida, denominada hiperdirecta, que envía información

de la corteza y tálamo a los núcleos de salida pasando antes por el núcleo subtalámico (Tepper et al., 2007).



**Figura 1. Componentes de los ganglios basales.** Los núcleos principales de los ganglios basales están localizados a nivel dorsal. El estriado es el núcleo de entrada de los ganglios basales y recibe proyecciones glutamatérgicas de corteza y tálamo, mientras que envía proyecciones GABAérgicas directamente a los núcleos de salida conformados por la SNr y el globo pálido interno, inhibiéndolos y facilitando la actividad del tálamo; o puede inhibir al globo pálido externo, y de esta forma desinhibir al núcleo subtalámico quien activa a los núcleos de salida mediante sus proyecciones glutamatérgicas, y estos inhiben al tálamo. La modulación entre excitación e inhibición de los núcleos de salida está dada por la dopamina liberada de la SNC. (NST-núcleo subtalámico, GPe- globo pálido externo, GPi- globo pálido interno, SNC- substancia nigra compacta, SNr- substancia nigra reticulada) Esquema modificado de Tepper et al., 2007.

## **b. Substancia nigra reticulada: señalización y función**

La substancia nigra y el segmento interno del globo pálido son estructuras que componen a los núcleos de salida, y ejercen una influencia importante en los núcleos talámico ventral lateral, ventral anterior, parafascicular-centromediano y al tallo cerebral, quienes a su vez proyectan hacia áreas asociativas motoras, prefrontales, temporales y parietales. Esto favorece que los ganglios basales puedan participar en procesos inherentes al movimiento, la cognición, la emoción y la motivación (Tepper et al., 2007). La SNr también envía proyecciones hacia el colículo superior y hacia el tegmento pontino, núcleos que modulan la conducta orientativa (movimientos sacádicos de los ojos) y el control de la postura y la locomoción, respectivamente. Debido a que las células de la SNr tienen actividad espontánea, éstas ejercen una inhibición tónica en sus estructuras blanco oponiéndose al movimiento (Deniau et al., 2007). El balance entre excitación e inhibición en los ganglios basales es regulado en gran medida por la dopamina (Guatteo et al., 2009).

## **c. Neurotransmisión sináptica en la SNr**

### **i. Neurotransmisión GABAérgica**

Los ganglios basales tienen un alto grado de interconectividad, misma que es regulada por la abundante presencia de aferencias GABAérgicas. El ácido  $\gamma$ -aminobutírico es el principal neurotransmisor inhibitorio en el cerebro adulto. Es sintetizado a partir del aminoácido L-glutamato en una reacción catalizada por la descarboxilasa de ácido glutámico, quien puede estar presente en dos tipos (GAD 65 y 67). Es liberado de las terminales nerviosas en una forma dependiente de calcio por liberación vesicular. Para terminar su señalización, el GABA es recapturado por un transportador de GABA (GATs) en las terminales sinápticas o en astrocitos cercanos (Cherubini and Conti, 2001). Una vez recapturado, el GABA es transaminado por la enzima GABA transaminasa (GABA-T), siendo el  $\alpha$ -cetoglutarato el aceptor de nitrógeno, produciendo succinato semialdehído y glutamato (Malaspina et al., 2009). Las sinapsis GABAérgicas se encuentran frecuentemente en el soma, en las dendritas

proximales y en los segmentos axónicos iniciales, aunque también se pueden localizar en segmentos distales y espinas dendríticas (Schousboe and Waagepetersen, 2007, Owens and Kriegstein, 2002).

Existen tres tipos de receptores que se activan con GABA: el receptor GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub> que son de índole ionotrópico y el receptor GABA<sub>B</sub> que es de tipo metabotrópico. Los receptores a GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub> son receptores pentaméricos altamente relacionados entre sí, que permiten el paso de iones cloro por la membrana postsináptica, pero el primero está conformado por varios tipos de subunidades, mientras que el segundo puede estar compuesto de uno o de varios tipos de subunidades  $\rho$ . En cambio, el receptor GABA<sub>B</sub> tiene 3 isoformas (R1a, R1b y R2) y se encuentra acoplado a proteínas G heterotriméricas (Owens and Kriegstein, 2002). En los ganglios basales, el receptor GABA<sub>A</sub> se localiza predominantemente en las postsinapsis inhibitorias en el soma de las neuronas, mientras que el receptor GABA<sub>B</sub> puede encontrarse a nivel presináptico y extrasináptico (Boyes and Bolam, 2007).

## **ii. Neurotransmisión dopaminérgica**

La dopamina (3-hidroxitiramina) es una monoamina miembro de la familia de las catecolaminas, sintetizada a partir del precursor L-tirosina por la enzima limitante tiroxina hidroxilasa y la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos, también conocida como descarboxilasa DOPA citosólica. Una vez sintetizada, la dopamina es almacenada en vesículas sinápticas desde donde puede ser liberada en una forma dependiente de calcio al llegar potenciales de acción. La actividad de esta catecolamina finaliza cuando es recapturada al interior de la célula por transportadores de dopamina específicos dependientes de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> (DAT), o al ser degradada por las enzimas monoamino oxidasa (MAO) y la aldehído deshidrogenasa (el producto final es ácido 3,4-dihidroxiifenilacético, DOPAC), además de la catecol-O-metiltransferasa (COMT, que produce 3 metoxitiramina, 3-MT) (Beaulieu and Gainetdinov, 2011).

La dopamina ejerce su efecto a través de receptores específicos que pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G de 7 segmentos transmembrana. Existen 5 tipos de receptores de dopamina y de acuerdo al tipo de proteína G que acoplan se clasifican como sigue:

- Los receptores tipo D1, cuyos miembros son los receptores D1 y D5, están acoplados a una proteína *Gas/olf* y tienen efectos estimulatorios en la neurotransmisión (Tiberi et al., 1991).
- Los receptores de tipo D2, que incluyen a los receptores D2, D3 y D4, están acoplados a una proteína *Gai/o* y generan inhibición de la neurotransmisión (Andersen et al., 1990).

El efecto antagónico de estos dos tipos de receptores permite modular la transmisión glutamatérgica y GABAérgica en el cerebro, por ejemplo, en el estriado la activación de los receptores D1 facilitan la actividad de la vía directa mientras que la activación de los receptores D2 inhiben a la vía indirecta promoviendo el movimiento (Beaulieu and Gainetdinov, 2011, Vallone et al., 2000).

Una parte de la liberación somatodendrítica de dopamina en el cerebro medio no es de tipo sináptico, y un número importante de receptores de dopamina en este sitio son extrasinápticos. Para activarlos, la dopamina liberada debe difundir hasta alcanzar tales sitios de acción en un proceso conocido como transmisión por volumen. Las neuronas dopaminérgicas de la SNc pueden liberar neurotransmisor desde sus dendritas (Windels and Kiyatkin, 2006) y se ha observado que en la SNr predomina la liberación de dopamina dendrítica sobre la axonal, ya que con ella el neurotransmisor puede difundir distancias importantes sin encontrar sitios de recaptura (Cragg et al., 2001, Rommelfanger and Wichmann, 2010).

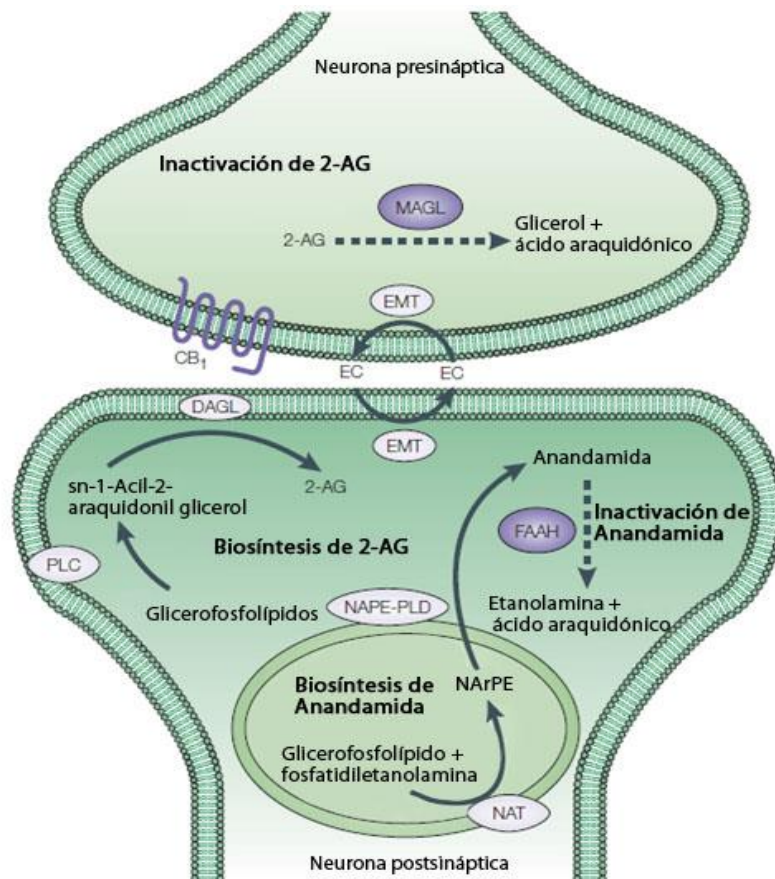
#### **d. Modulación de la transmisión sináptica por endocannabinoides**

Los cannabinoides son un conjunto de compuestos naturales o sintéticos altamente lipofílicos que se parecen estructuralmente entre sí o que mimetizan los efectos producidos por los compuestos hallados en la planta *Cannabis sativa*, de los cuales el  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) es su principal componente psicoactivo (Pertwee, 2005). Los mamíferos pueden sintetizar, bajo demanda, cannabinoides endógenos (endocannabinoides) derivados de ácidos grasos de cadena larga poliinsaturada presentes en la membrana, principalmente del ácido araquidónico. Como ejemplos de endocannabinoides se tienen: araquidoniletanolamida (anandamida; AEA), 2-araquidonilglicerol (2-AG), éter de noladina, virodamina y N-araquidonildopamina (NADA) (figura 2). Concentraciones elevadas de calcio intracelular o su movilización desde almacenes intracelulares inducen la biosíntesis de anandamina y 2-AG, lo cual ocurre por la dependencia de altas concentraciones de calcio requeridas por las enzimas biosintéticas NAT (N-aciltransferasa.), NAPE-PLD (fosfolipasa D selectiva de N-acilfosfatidial-etanolamina) y DAGLs (diacilglicerol lipasa, DAGL- $\alpha$  y DGL- $\beta$ ) (Svizenska et al., 2008, Di Marzo et al., 2004).

La AEA puede ser sintetizada a través de varias vías. La ruta principal es catalizada por N-aciltransferasa (NAT) que transfiere al ácido araquidónico de la fosfatidilcolina (u otros glicerofosfolípidos como 1-acil liso fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y cardiolipina) a la fosfatidiletanolamina presente en la membrana, generando N-araquidonil fosfatidiletanolamina (NArPE). El último paso requiere que la enzima NAPE-PLD actúe sobre NArPE para que catalice la liberación de AEA y ácido fosfatídico (Maccarrone et al., 2010)

El transporte de AEA dentro y fuera de la célula aún es poco conocido. Se ha propuesto que ocurre por difusión pasiva, mediante la formación de complejos AEA-colesterol; a través de transporte facilitado, y por endocitosis relacionada con caveolina. Hallazgos recientes han sugerido reconsiderar el dogma de que los endocannabinoides son exclusivamente sintetizados y liberados bajo demanda (las concentraciones basales de esta sustancia en el cerebro son bajas comparadas con la mayoría de los neurotransmisores) y sugieren que su control metabólico es

complementado por transporte intracelular a través de proteínas de unión intracelular a AEA (AIBP, por sus siglas en inglés “AEA intracelular binding proteins”) y almacenamiento en reservorios específicos, como los adiposomas, organelo intracelular que participan en la movilización, acumulación y señalización de lípidos. Proteínas de unión a AEA que incluyen HSP70 (por sus siglas en inglés, “heat shock protein 70”), albúmina entre otras, podría permitir el transporte de AEA a través del citosol hacia sus diferentes sitios intracelulares y se propone que los adiposomas pueden hacer contacto con diferentes organelos, además, los adiposomas tienen sitios de unión para enzimas que metabolizan a los endocannabinoides. (Maccarrone et al., 2010).



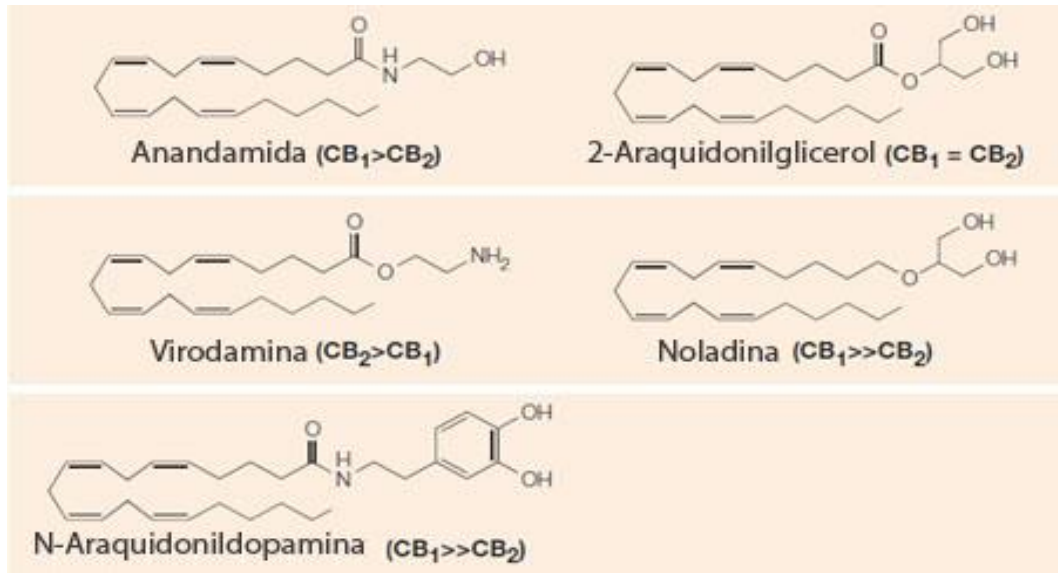
**Figura 3. Metabolismo de los principales endocannabinoides.** Anandamida (AEA) y 2-araquidonilglicerol (2-AG) son sintetizados bajo demanda en neuronas postsinápticas a partir de fosfolípidos de membrana y son liberados al medio extracelular posiblemente a través de un transportador de endocannabinoides (EMT). Los endocannabinoides actúan en receptores presentes en las neuronas presinápticas o pueden ser recapturados y degradados por enzimas específicas: 2-AG es degradado en las neuronas presinápticas mediante la monoacilglicerol lipasa (MAGL) y AEA mediante la hidrolasa de amidas de ácidos grasos (FAAH) en neuronas



postsinápticas. Fosfolipasa C (PLC), Diacilglicerol lipasa (DAGL), fosfolipasa D específica de N-acilfosfatidil-etanolamina (NAPE-PLD), N-aciltransferasa (NAT) (Di Marzo, 2014).

La inactivación de los endocannabinoides en el cerebro ocurre cuando son recapturados del medio extracelular al intracelular, a nivel presináptico y postsináptico, por medio de un transportador de membrana para endocannabinoides, el cual aún no está caracterizado. Una vez dentro de la célula, algunos endocannabinoides son hidrolizados por acción de la enzima FAAH (“fatty acid amide hydrolase”), como ocurre con la anandamida y oleiletanolamida. Por otra parte, el 2-AG es degradado por la MAGL (“monoacylglycerol lipase”) generando ácido araquidónico y glicerol (Di Marzo et al., 2004). Además, una exposición crónica de los cannabinoides puede desencadenar respuestas en el receptor como regulación a la baja, cambios conformacionales e internalización, que tienen como fin reducir su interacción con el agonista. (Svizenska et al., 2008).

Entre los endocannabinoides más estudiados están la anandamida y el 2-AG, quienes cumplen funciones neuromoduladoras e inmunomoduladoras actuando como mensajeros retrógrados en el sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP). En el SNC, se ha estudiado que los endocannabinoides pueden regular funciones cognitivas y emocionales producidas por circuitos neuronales específicos de corteza, hipocampo y amígdala como la plasticidad sináptica de corto y de largo plazo (supresión de la neurotransmisión excitatoria e inhibitoria inducida por despolarización, la potenciación y depresión a largo plazo y la depresión a largo plazo de la inhibición sináptica). En el caso de la circuitería originada en los ganglios basales y cerebelo, los endocannabinoides podrían estar participando en la modulación del movimiento y la postura. (Di Marzo et al., 2004).



**Figura 2. Endocannabinoides derivados del ácido araquidónico:** Anandamida (AEA), 2-araquidonilglicerol (2-AG), Virodamina, Noladina y N-Araquidonildopamina (NADA). Cada compuesto tiene diferentes afinidades por los receptores de cannabinoides CB1 y CB2. (Di Marzo, 2014).

En condiciones patológicas, los niveles de endocannabinoides pueden aumentar en áreas cerebrales específicas, por ejemplo, en el hipocampo seguido de excitotoxicidad por glutamato y de estímulos estresantes; en el hipotálamo y en el cerebro anterior límbico después de privación de comida; en la amígdala basolateral tras el recuerdo de una memoria no placentera; y en la sustancia gris periacueductal después de la administración de estímulos dolorosos. Esta potenciación de la señalización por endocannabinoides puede proteger a las neuronas del daño a través de un mecanismo de retroalimentación negativa. También se ha encontrado hiperactividad en la señalización por endocannabinoides en varios modelos animales de enfermedades neurodegenerativas, tales como: modelos de enfermedad de Parkinson (rata reserpinizada y lesionada con 6-hidroxi dopamina) (Di Marzo et al., 2000, Maccarrone et al., 2003) y modelo de enfermedad de Alzheimer (ratas tratadas con  $\beta$ -amiloides en hipocampo) (referencia a datos no publicados en Di Marzo et al., 2004). Probablemente, el aumento de endocannabinoides en estas condiciones tenga como propósito inicial contrarrestar la hiperactividad neuronal y la inflamación local, sin

embargo, es probable que la hiperactivación permanente de este sistema contribuya al desarrollo de la sintomatología en las enfermedades de Parkinson y de Alzheimer, y de esta forma a la inhibición de la actividad motora y a la pérdida de la memoria (Di Marzo et al., 2004).

Existen evidencias que sugieren que la señalización GABAérgica en los ganglios basales puede ser modulada por el sistema de endocannabinoides. La alta densidad de receptores de cannabinoides en los ganglios basales mostrada por autoradiografía, así como la relación entre la disfunción de este sistema con desórdenes neuropsiquiátricos como Parkinson o Huntington pueden ser prueba de ello (Herkenham et al., 1991b, Van Bockstaele, 2012). Además, la actividad de las neuronas dopaminérgica mesencefálicas localizadas en el AVT y en la SN (principalmente la reticulata) también puede ser modulada por endocannabinoides a través de mecanismos que inhiben la liberación presináptica de neurotransmisores en neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo. Aunque los receptores CB1 no están localizados en estas neuronas, sí se encuentran en axones glutamatérgicos y GABAérgicos que convergen en ellas (Fitzgerald et al., 2012).

#### **i. Receptor de cannabinoides tipo 1 (CB1): señalización y función**

Los receptores de cannabinoides son miembros de la familia de receptores tipo Rodopsina de 7 segmentos transmembranales y están acoplados a proteínas G. Tienen un dominio N-terminal extracelular que posee sitios de glicosilación y un dominio C-terminal intracelular acoplado a proteínas  $G_{\alpha i/o}$ . Existen dos tipos de receptores de cannabinoides identificados que regulan la transmisión sináptica en el sistema nervioso central y periférico, y que tienen un 48% de identidad en su secuencia de aminoácidos: los receptores CB1 y CB2 (Stella, 2010, Pertwee, 2006). Ambos receptores inhiben a la adenilato ciclasa y activan a la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPKs). Mediante la acción de proteínas  $G_{\beta\gamma}$ , el receptor CB1 puede activar a canales de potasio tipo A (“A-type outward potassium channel”), y al canal de potasio rectificador de entrada (“inwardly rectifying potassium channel”) (Ho et

al., 1999), e inhibir al canal de potasio tipo D (“D-type outward potassium channel”) y a los canales de calcio tipo N y P/Q (“N-type, P/Q-type calcium channels”) (Howlett and Mukhopadhyay, 2000). Por otra parte, existen evidencias de que el receptor CB1 puede activar diferentes tipos de proteínas Gai y Gao (Gai1, Gai2, Gai3, Gao1 y Gao2) (Prather et al., 2000), además de que puede actuar a través de proteínas Gas (Pertwee, 2006). El efecto bifásico dependiente de la concentración del agonista (activación de Gas en vez de Gai/o) puede ser un mecanismo que previene la excitabilidad excesiva tras la activación robusta del receptor.

A nivel experimental, se puede desenmascarar un mecanismo de modulación de los endocannabinoides sobre la liberación de neurotransmisor, ya que una fuerte despolarización de neuronas postsinápticas es seguida de activación de receptores CB1 presinápticos quienes pueden suprimir la liberación de GABA y o glutamato mediada por endocannabinoides, fenómeno conocido como supresión de la inhibición inducida por despolarización (DSI, “depolarization-induced suppression of inhibition”) o supresión de la excitación inducida por despolarización (DSE, “depolarization-induced suppression of excitation”) (Matyas et al., 2006).

Los endocannabinoides muestran diferentes afinidades por los receptores CB1 y CB2 (Di Marzo, 2012). La virodamina, el ácido araquidónico y la etanolamina se unen como agonistas parciales mediante enlaces éster al receptor CB1 y como agonistas completos al receptor CB2 (Console-Bram et al., 2012). El 2-AG tiene menor afinidad por los receptores de cannabinoides en comparación con la anandamida, sin embargo, debido a que se encuentra en mayor concentración comparado con otros cannabinoides, se considera que es el principal canabinoide endógeno en el cerebro (Svizenska et al., 2008).

Además de los receptores de cannabinoides clásicos, existen otro tipo de receptores GPCR (receptor acoplado a proteínas G), canales iónicos (canales de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>), receptores de canales iónicos (TRP, “transient receptor potential cation channel”) y receptores nucleares (PPAR, “peroxisome proliferator-activated receptor”) que tienen sitios de unión para endocannabinoides. Por ejemplo, la AEA tiene la habilidad de activar diferentes vías de señalización a través de receptores con diferentes

localizaciones dentro de la célula; estos blancos de AEA tienen un sitio de unión extracelular para receptores CB1 y CB2, un sitio de unión intracelular para TRPV1 y otro dentro del núcleo como en el caso del receptor PPAR. La concentración de AEA responsable de activar un tipo particular de receptor difiere para cada uno: concentraciones nanomolares /submicromolares activan a los receptores de cannabinoides, mientras que concentraciones micromolares se requieren para activar a los receptores TRPV1 o PPAR (Maccarrone et al., 2010).

La AEA puede unirse al receptor TRPV ("transient receptor potential vanilloid") e induce vasodilatación en preparaciones vasculares aisladas como consecuencia de la liberación del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP, "calcitonin gene-related peptide"), mientras que NADA puede activar a los receptores TRPV del ganglio de la raíz dorsal y del hipocampo facilitando la liberación de sustancia P y CGRP. Otros receptores putativos de endocannabinoides son el receptor de cannabinoides endotelial no CB1/no CB2, el GPR55 y GPR119. El receptor GPR55 pertenece a la subfamilia de receptores purinérgicos y sólo comparte un 13.5% y 14.4% de homología con los receptores CB1 y CB2, respectivamente (Mackie and Stella, 2006). Su activación, en neuronas sensoriales de ratón, puede inhibir las corrientes de potasio tipo M y mediante la participación de proteínas Gαq, Gα11, RhoA y PLC incrementa el calcio intracelular mediado por el receptor IP<sub>3</sub>, resultando en un incremento de la excitabilidad neuronal (Lauckner et al., 2008). Se ha propuesto que los endocannabinoides activan a los receptores GPR55 de forma indirecta mediante la fosfolipasa A1 (PLA1) o A2 (PLA2), quienes producen LPI (1-α-lisofosfatilinositol), un agonista potente y eficaz de GPR55 a concentraciones mayores de 1μM. La participación de los endocannabinoides en la activación de estos receptores aún no ha quedado del todo clara debido a discrepancias entre los estudios que la apoyan de los que la niegan (De Petrocellis and Di Marzo, 2010).

La conducta promiscua de estos endocannabinoides, en particular AEA y NADA, que activan a receptores estructuralmente poco relacionados parece deberse a su flexibilidad conformacional. La flexibilidad conformacional de las cadenas acil y N-

alquil de endocannabinoides aciletanolamida /endovaniloides les permiten interactuar también con otros blancos moleculares (De Petrocellis and Di Marzo, 2010).

Se han desarrollado otro tipo de compuestos que tienen mayor afinidad por los receptores de cannabinoides, y junto con los endocannabinoides, comprenden una amplia variedad de compuestos naturales y sintéticos que se agrupan en 5 clases:

- Los cannabinoides clásicos derivados de dibenzopiranos tricíclicos aislados de la planta *Cannabis sativa* (por ejemplo THC) o análogos sintéticos parecidos (HU-210) que se unen de forma no selectiva a CB1 y CB2.
- Los cannabinoides no clásicos, quienes son estructuralmente similares a los clásicos, más son análogos AC-bicíclicos y ACD-tricíclicos que les falta el anillo dihidropirano. (por ejemplo, CP-55940 que es un agonista completo para CB1 y CB2).
- Los aminoalquilindoles son estructuralmente muy diferentes de los compuestos clásicos y no clásicos. WIN 55, 212-2, un agonista completo de ambos receptores de cannabinoides, exhibe dos veces mayor afinidad hacia CB2 que hacia CB1.
- Ligandos de cannabinoides derivados del ácido araquidónico, quienes son los ligandos endógenos para los receptores de cannabinoides y algunos receptores tipo canabinoide (por ejemplo AEA, 2-AG).
- Finalmente, compuestos de tipo diarilpirazol (por ejemplo, SR141716 o rimonabant) se caracterizan por ser agonistas inversos de los receptores de cannabinoides (Stella, 2010).

Un grupo de antagonistas del receptor CB1 (SR-141716, AM-251, AM-281, LY-320135) y del receptor CB2 (SR-144528) se comportan como agonistas inversos, indicando que estos receptores pueden estar activos constitutivamente (Pertwee, 2005, Console-Bram et al., 2012).

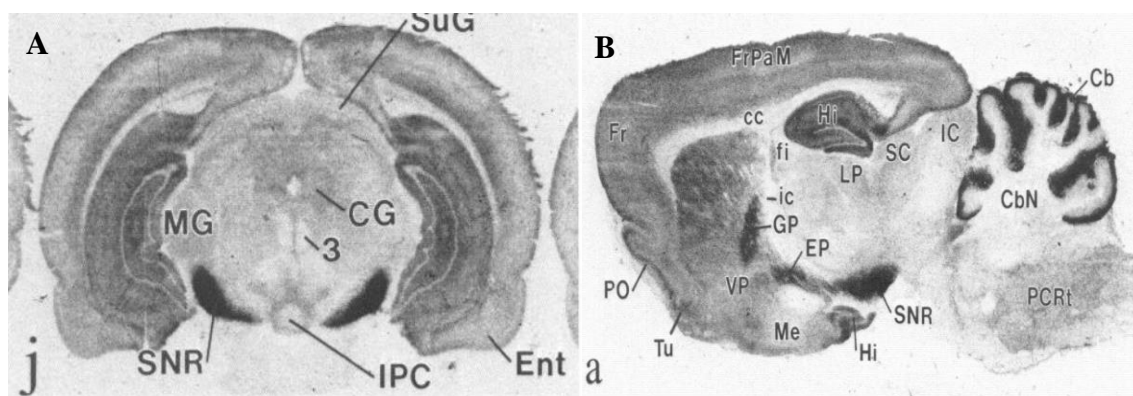
Estudios farmacológicos indican que los cannabinoides pueden regular la función celular de forma independiente a la activación de receptores de cannabinoides, esto a

concentraciones micromolares, mediante tres posibles mecanismos de acción: cambiando la fluidez de la membrana celular, interactuando con proteínas que no transducen señales directamente, y a través de la activación de otros receptores diferentes a CB1 y CB2 (Stella, 2010).

## **ii. Localización de receptores CB1 en los ganglios basales**

Los receptores de cannabinoides se encuentran ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central y periférico, de manera diferencial. Estudios realizados mediante autoradiografía e inmunohistoquímica en cerebros de rata muestran que el receptor CB1 es uno de los GPCR (por sus siglas en inglés, receptores acoplados a proteínas G) más abundantes en el cerebro. Los ganglios basales tienen una abundante expresión de receptores de cannabinoides, en particular en axones del globo pálido, del núcleo entopeduncular y en la sustancia nigra reticulada (Figura 4 y tabla 1). El caudado-putamen y el estriado dorsolateral también tienen un marcaje importante comparado con el estriado ventromedial y el núcleo accumbens que muestran un marcaje moderado, o con el de las demás áreas de los ganglios basales que tienen un marcaje más disperso. Esta abundante localización de los receptores CB1 refuerza la idea de su posible participación en la modulación de la actividad motora por parte de los cannabinoides (Herkenham et al., 1991b, Tsou et al., 1998).

La localización específica de estos receptores fue evidenciada en los ganglios basales por un estudio en el que se empleó la destrucción neuroquímica selectiva de neuronas estriatales con ácido iboténico, lo cual causó una gran pérdida de la unión del compuesto [<sup>3</sup>H]-CP 55,940 al receptor CB1 en el estriado y en sus blancos de proyección: globo pálido, núcleo entopeduncular y SNr. Después de la lesión del haz del cerebro medio con 6-OHDA la unión de [<sup>3</sup>H]-CP 55,940 no se altera, lo cual sugiere que los receptores de cannabinoides no están localizados en aferentes dopaminérgicas (Herkenham et al., 1991a).



**Figura 4. Presencia del receptor CB1 en la sustancia nigra reticulada de la rata.** **A)** Autoradiografía de la unión del ligando  $^3\text{H}$ -CP55,940 [10 nM] en un corte coronal de cerebro de rata y **B)** Rebanada sagital que muestra el denso marcaje en SNr, globo pálido, núcleo entopeduncular, giro dentado y cerebelo por el ligando  $^3\text{H}$ -CP55,940 [10 nM] . (Herkenham et al., 1991b). (3- núcleo oculomotor, Ent- corteza entorrinal, IPC- núcleo central intrapeduncular, MG- núcleo geniculado medial, SuG- capa gris superficial del colículo superior, Cb.cerebelo).

<b>Ganglios Basales</b>	<b>pmol/mg de proteína</b>
<b>Núcleo Accumbens</b>	2.27±0.42
<b>Caudado-putamen medial</b>	2.47±0.42
<b>Caudado-putamen lateral</b>	4.33±0.42
<b>Globo pálido</b>	6.42±0.42
<b>Pálido ventral</b>	1.56±0.42
<b>Núcleo Entopeduncular</b>	5.44±0.42
<b>Substancia nigra reticulada</b>	6.33±0.42
<b>Área tegmental ventral</b>	1.46±0.42

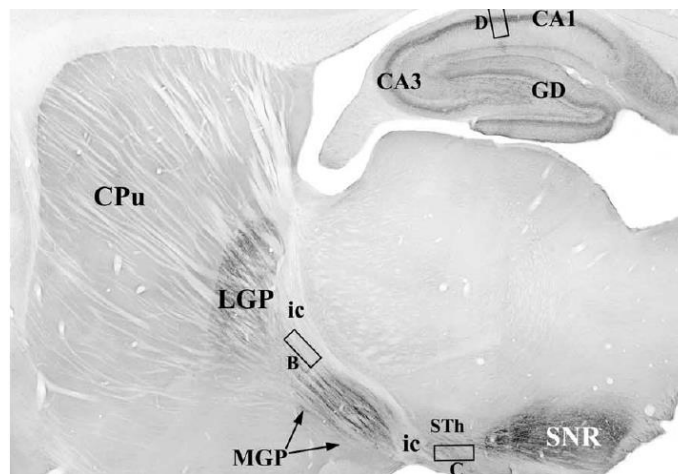
**Tabla 1. Distribución del receptor CB1 en los ganglios basales de rata.** Los valores reflejan la cantidad de unión de  $^3\text{H}$ -CP55, 940 a una concentración 10 nM (Herkenham et al., 1991b).

Adicionalmente, un estudio realizado en rata mediante inmunocitoquímica y microscopía electrónica evidenció que la inmunoreactividad del receptor CB1 se encuentra presente en la membrana de axones preterminales y axones terminales de



todos los núcleos de los ganglios basales, principalmente de terminales GABAérgicas, mientras que las glutamatérgicas son raramente encontradas. Además, el estudio muestra la presencia del receptor CB1 en la membrana de los axones de los núcleos que conforman la vía estriato-nigral (figura 5) (Matyas et al., 2006)

Es importante recalcar que no existe una clara correlación de la presencia del ARNm del receptor CB1 con la expresión de la proteína en las dos principales estructuras de salida de los ganglios basales (globo pálido y SNr), a diferencia del estriado en donde la alta concentración de ARNm sí corresponde con una alta expresión del receptor en este núcleo (Matyas et al., 2006). Se ha propuesto que dicho marcaje en estas estructuras se deba a los axones proyectados por las neuronas espinosas medianas del estriado hacia el globo pálido y a la SNr y no así por la expresión directa de este receptor en neuronas específicas de tales núcleos (Herkenham et al., 1991a). No obstante, también cabe la posibilidad de que la técnica empleada en tales estudios para detectar el ARNm del receptor CB1 no esté del todo optimizada y que la falta de detección involucre problemas debidos a la concentración, a la penetración de la sonda en el tejido o a la identificación de variantes de splicing del receptor, mismas que aún siguen en estudio (Ong and Mackie, 1999).



**Figura 5. Presencia del receptor CB1 en la vía de proyección estriato-nigral en rata.** La micrografía muestra una fuerte inmunoreactividad para el receptor CB1 en las proyecciones de la vía estriato-nigral (LGP-globo pálido lateral, MGP-globo pálido medial, SNR, STh-núcleo subtalámico) (Matyas et al., 2006).

A nivel de sistema nervioso periférico, evidencias inmunohistoquímicas muestran que los receptores CB1 son sintetizados en neuronas de la raíz dorsal para posteriormente ser enviados a los nervios periféricos por transporte anterógrado, mientras el receptor CB2 parece ser sintetizado en el bazo para después ser funcional en mastocitos (Hohmann and Herkenham, 1999). Se puede encontrar al receptor CB1 en terminales glutamatérgicas y GABAérgicas, por lo que existe la posibilidad de que regule ambos tipos de neurotransmisión sináptica (Howlett et al., 2002)

#### **e. Interacción de los sistemas endocanabinoide-dopaminérgico**

El sistema de endocanabinoides y el sistema dopaminérgico tienen en común la función de modular la neurotransmisión sináptica en estructuras cerebrales específicas y de esta forma, permitir una adecuada señalización durante condiciones fisiológicas; en caso contrario, la desregulación de ambos sistemas está implicada en la generación y mantenimiento de ciertas patologías neurodegenerativas. De ahí que la importancia de estos sistemas sea evidente y justifique la alta expresión de receptores pertenecientes a ambos sistemas en el cerebro.

La primera indicación de la posible interacción entre los sistemas endocanabinoide-dopaminérgico ocurre cuando los receptores de ambos están coexpresados en la misma neurona. Estudios de hibridación *in situ* realizados en ratas mostraron altos niveles de ARNm para el receptor D1 y D2 en el estriado, mismos que colocalizan con el receptor CB1 (Hermann et al., 2002).

La señalización inducida por la activación de los receptores de cannabinoides ha sido considerada clásicamente como inhibitoria. En particular, la activación del receptor CB1 por sus agonistas conlleva una disminución en la acumulación de AMPc atribuido a la activación de proteínas  $G_i$  sensibles a la Toxina Pertussis (Serpa et al., 2015, Pertwee, 2006, Jarbe et al., 2014). La regulación de la transmisión sináptica mediada por cannabinoides ocurre en terminales GABAérgicas y escasamente en las glutamatérgicas, más parece no incluir directamente a las neuronas dopaminérgicas, lo cual concuerda con la falta de expresión de receptores de cannabinoides en este tipo

neuronal. Sin embargo, se ha propuesto que los receptores de cannabinoides pueden afectar de forma indirecta la liberación de dopamina de estas neuronas debido a la participación de los principales blancos de proyección de las neuronas espinosas medianas quienes sí expresan de forma abundante al receptor CB1 y cuyos axones proyectan directamente a las neuronas dopaminérgicas de la SNc. Lo anterior podría explicar la discrepancia existente entre estudios que argumentan a favor o en contra de la modulación de la transmisión dopaminérgica mediada por el sistema de cannabinoides (Matyas et al., 2006).

Recientemente, se ha encontrado que los sistemas endocanabinoide y dopaminérgico pueden estar interactuando a nivel de sus receptores para generar nuevas vías de señalización, diferentes de las activadas en forma individual para cada uno de los sistemas. La formación de complejos heteroméricos para los receptores CB1 y los receptores de dopamina D2 ha sido mostrada mediante experimentos de coimmunoprecipitación y ensayos de purificación por afinidad, además, el análisis funcional de dichos complejos ha evidenciado diferencias en la ruta de señalización que siguen. Así, se ha encontrado que en sistemas de expresión heterólogos la activación del receptor D2 simultáneamente con la estimulación del receptor CB1 genera la formación de un complejo que acopla a proteínas G $\alpha$ s, resultando en un incremento en la acumulación de AMPc y en la fosforilación de ERK 1/2, caso contrario a la activación individual de los receptores CB1 y D2 quienes se acoplan a proteínas G $\alpha$ i/o. La interacción física es mediada por el carboxilo terminal del receptor CB1 y la tercera asa intracelular del receptor D2 (Kearn et al., 2005, Khan and Lee, 2014).

Evidencias adicionales indican que el receptor CB1 puede facilitar la acumulación de AMPc mediante un cambio de acople con proteínas G $\alpha$ s, al emplear concentraciones del agonista bajas en sistemas de transfección heterólogos (Pertwee, 2005, Chen et al., 2010, Calandra et al., 1999). Y se ha encontrado que el cambio de acople de la proteína G puede atribuirse a un aminoácido presente en un motivo altamente conservado (DRY(X)<sub>5</sub>PL) en el “loop” intracelular 2 (ICL2): L222. La mutación de

este aminoácido impide el acople de la proteína Gs con la consecuente falta de acumulación de AMPc (Chen et al., 2010).

En los ganglios basales se ha observado un fenómeno similar en el cual participa la dopamina. En cultivos primarios de estriado de rata, la activación del receptor CB1 produce una disminución en la acumulación de AMPc, no así, la activación concurrente de los receptores CB1 y de los receptores tipo D2 que resulta en un incremento en la acumulación de AMPc debido aparentemente a la activación de una proteína Gs por parte del receptor CB1 (Glass and Felder, 1997). En rebanadas del globo pálido de la rata se ha determinado que concentraciones bajas del agonista ACEA y la coactivación del receptor D2, facilitan la liberación de GABA, mientras que por sí sólo y a concentraciones mayores tiende a inhibir la liberación (Gonzalez et al., 2009). Este fenómeno también ha sido explicado en términos de heteromerización de los receptores CB1/D2 que muestran un comportamiento similar en la formación de AMPc en sistemas de expresión heterólogos (Kearn et al., 2005).

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La modulación de la liberación de GABA, principal neurotransmisor inhibitorio en los ganglios basales, es dada mayoritariamente por dopamina. En el globo pálido, la activación de receptores tipo D2 o CB1 disminuyen la liberación de GABA, sin embargo, su coactivación facilita la liberación del mismo neurotransmisor, probablemente por un cambio en el acople de la proteína Gi por Gs del receptor CB1 y/o heteromerización con el receptor D2. En este contexto, la dopamina tiene un mecanismo adicional en el control de la liberación de GABA ya que puede provocar un “switch” en la vía de señalización del receptor CB1. A la fecha se desconoce si tal efecto en la liberación de GABA puede ocurrir en otros núcleos de los ganglios basales o del cerebro, donde se co-expresan en forma abundante receptores de endocannabinoides tipo CB1 y receptores de dopamina de la familia D2.

En la sustancia nigra, se ha encontrado una alta concentración de receptores de cannabinoides CB1 y se ha visto que la dopamina ejerce diversos efectos sobre la liberación de GABA. Por otra parte los receptores a dopamina también tiene una alta expresión: a través de receptores D1 se facilita la liberación de GABA proveniente de las proyecciones estriato-nigrales; la activación de receptores D3 potencia el efecto de la activación de los receptores D1 en una porción de estas aferentes (Cruz-Trujillo et al., 2013). Por otro lado, inhibe la liberación de GABA al activar receptores D4 presentes en las terminales pálido-nigrales (Acosta-García et al., 2009). Por ello cabe la posibilidad de que el cambio de acople también ocurra en tal región cerebral, dada la presencia de dos de los receptores de la familia D2: el D3 y el D4.

Entender los efectos de la acción dopaminérgica sobre la liberación de GABA en la SNr, ayudará a entender si es un efecto generalizado en los ganglios basales o es un evento que solo ocurre en el globo pálido, ya que a la fecha el fenómeno de “switch” solo se ha reportado en este núcleo. Por otro lado, la SNr es un núcleo de salida importante en la generación de movimientos lo que depende de un adecuado control entre excitación (Glutamatérgica) e inhibición (GABAérgica) de sus neuronas de proyección, es por ello que el entender los mecanismos por los cuales la dopamina regula la neurotransmisión inhibitoria en la SNr es importante para el control motor.

### **III. HIPÓTESIS**

La activación de receptores de dopamina tipo D2 en la SNr modula el efecto de la activación del receptor CB1 sobre la liberación de [<sup>3</sup>H-GABA].

### **IV. OBJETIVOS**

#### **a. Objetivo general**

Determinar el efecto de la coactivación del receptor CB1 y el receptor de dopamina tipo D2 sobre la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA en la SNr de la rata.

#### **b. Objetivos específicos**

- Estudiar el efecto de la activación del receptor CB1 sobre la liberación de [<sup>3</sup>H] GABA.
- Dilucidar si la dopamina endógena que activa receptores D2-like modifica el efecto de la activación del receptor CB1 sobre la liberación de [<sup>3</sup>H] GABA.
- Determinar qué tipo de receptor de dopamina de la familia D2 modifica la respuesta de la activación del receptor CB1 en la liberación de [<sup>3</sup>H] GABA.
- Estudiar la participación de la PKA en la liberación de [<sup>3</sup>H] GABA durante la coactivación de los receptores CB1 y el receptor de dopamina tipo D2.

## V. MATERIAL Y MÉTODO

### a. Técnica de liberación

Todos los experimentos fueron realizados en ratas macho Wistar de 180 a 220 gr de peso, (10 animales para cada experimento) provenientes del bioterio general (UPEAL) del CINVESTAV. Cada rata fue decapitada y su cerebro fue extraído rápidamente para montarlo en un vibrátomo y cubrirlo con Krebs frío (punto agua-nieve). La composición del Krebs empleado (denominado 3mM de  $K^+$ ) es la siguiente: NaCl 118.25 mM, KCl 1.75 mM,  $MgSO_4$  1mM,  $KH_2PO_4$  1.25mM,  $NaHCO_3$  25mM,  $CaCl_2$  2mM, Dextrosa 10 mM y ácido aminooxiacético 10 $\mu$ M (AOAA). El AOAA inhibe a la GABA transaminasa y por tanto evita que la marca se degrade. Del cerebro, se obtuvieron rebanadas coronales de 300  $\mu$ m de grosor, de las cuales se identificó y disecó la SNr con ayuda de un microscopio estereoscópico. Las rebanadas de SNr se estabilizaron a 37°C en Krebs [ $K^+$  3mM] con burbujeo continuo de  $O_2/CO_2$  (95:5, v v<sup>-1</sup>) durante 20 minutos, después se incubaron con [<sup>3</sup>H]-GABA 8nM en 2ml de Krebs por 30 minutos. Para eliminar el exceso de marcaje, se realizaron 3 lavados con Krebs [ $K^+$  3mM], en el que se incluyó ácido nipecótico [10  $\mu$ M], el cual es un inhibidor de la recaptura de GABA. Las rebanadas de SNr fueron colocadas en razón de 3 a 4 en cada una de las 20 cámaras de un sistema de perfusión en vertical, con el cual se perfundió Krebs [ $K^+$  3mM] a un flujo de 0.5 ml/min por 20 minutos. La liberación basal de [<sup>3</sup>H]-GABA se obtuvo colectando las primeras cuatro fracciones en intervalos de 4 minutos (2ml finales para cada fracción).

La liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA fue facilitada con la perfusión de una solución Krebs con  $K^+$  [15mM] y se colectaron 6 fracciones más bajo tal condición. La composición del Krebs fue la siguiente: NaCl 106.25 mM, KCl 13.75 mM,  $MgSO_4$  1mM,  $KH_2PO_4$  1.25mM,  $NaHCO_3$  25mM,  $CaCl_2$  2mM, D-glucosa 10 mM y ácido aminooxiacético 10 $\mu$ M (AOAA). Al finalizar la colecta de las fracciones, el tejido se recuperó de las cámaras y fue tratado con 1ml de HCl [1N] durante 8 horas con la finalidad de cuantificar la cantidad total de tritio remanente en el tejido (Floran et al., 2004).

Las fracciones y el tejido fueron solubilizados y suspendidos uniformemente en líquido de centelleo, el cual estaba constituido por los siguientes componentes:

- Tolueno (solvente orgánico de tipo clásico que absorbe eficientemente la energía liberada).
- Tritón X-100 (emulsificador, detergente no iónico que asegura la correcta solvatación de la muestra acuosa con el solvente orgánico).
- PPO y POPOP (solutos primario y secundario respectivamente, capturan la energía liberada por el solvente y la emiten como luz visible de una longitud de onda aproximada de 420nm).

Finalmente, para cuantificar la marca de [<sup>3</sup>H]-GABA contenida en las fracciones y el tejido se utilizó un contador de centelleo líquido Beckman Coulter LS6500 Multipurpose Scintillation Counter.

#### **b. Pretratamiento de las ratas con reserpina**

Para eliminar el efecto de la dopamina endógena, las ratas fueron pre-administradas con reserpina (10mg/kg), vía subcutánea (Acosta-Garcia et al., 2009) 16 horas antes del experimento. La reserpina es un inhibidor de la recaptura vesicular de catecolaminas y serotonina la cual disminuye en un 69% la dopamina endógena en la SNr (Garcia et al., 1997).



### c. Análisis de datos

La liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA en la SNr se expresó como una fracción de la cantidad total contenida en el tejido:

$$\text{Lib de } [^3\text{H}]\text{GABA} = \frac{\text{RPM}}{\text{RPT}}$$

**RPM**= radioactividad presente en la muestra.

**RPT**= radioactividad presente en el tejido.

Los valores de la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA fueron normalizados estableciendo un cociente de cada una de las fracciones entre la fracción 4, que es la condición previa a la despolarización con K<sup>+</sup> [15 mM]. Posteriormente se determinó el área bajo la curva del curso temporal de la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA y se graficó el porcentaje con respecto al control tomándolo como 100 %. Los cálculos se realizaron con el programa GraphPad 6.

Los datos se expresaron como promedio ± error estándar (MEAN±SEM) y el análisis estadístico aplicado fue de una ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparaciones múltiples post-hoc de Dunnett, considerando un nivel de significancia estadística mínima de P<0.05. Los cálculos se realizaron con el programa GraphPad 6.

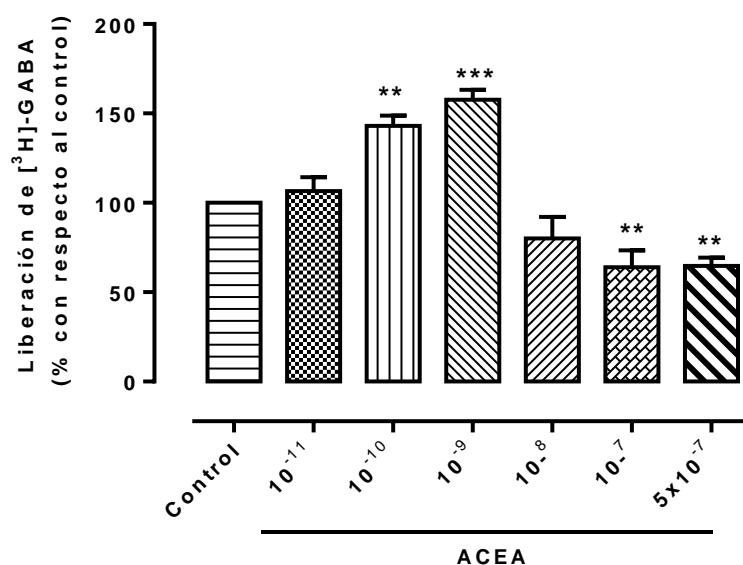
#### d. Fármacos

- **ACEA** (arachidonyl-2-chloroethylamide)
- **Reserpina** (3 $\beta$ , 16 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 18 $\beta$ , 20 $\alpha$ )-11,17-Dimethoxy-18-[(3,4,5-trimethoxybenzoyl)oxy] yohimban-16-carboxylic acid methyl ester
- **Sulpiride** (S)-(-)-5-Aminosulfonyl-N-[(1-ethyl-2-pyrrolidinyl)methyl]-2-methoxybenzamide
- **L-745,870** (3-[[4-(4-Chlorophenyl)piperazin-1-yl]methyl]-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridinehydrochloride)
- **AM-251** (1-(2,4-Dichlorophenyl)-5-(4-iodophenyl)-4-methyl-N-1-piperidinyl-1H-pyrazole-3-carboxamide).
- **H-89** N-[2-(p-Bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide dihydrochloride)

## VI. RESULTADOS

### a. Efecto bifásico del agonista del receptor CB1 ACEA sobre la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA

El agonista de los receptores CB1, ACEA genera dos respuestas diferentes en la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA en rebanadas de globo pálido de rata, las cuales dependen de la presencia de dopamina endógena liberada por la despolarización (Gonzalez et al., 2009). En este caso, se estudió el efecto que tiene la activación del receptor CB1 sobre la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA en la SNr de la rata. En la gráfica 1 se observaron las siguientes respuestas producidas por diferentes concentraciones de ACEA: la facilitación de la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA fue evidente con concentraciones de  $10^{-10}$  M y  $10^{-9}$  M, las cuales incrementaron la liberación en un 45 % y 54 % respecto al control, respectivamente; mientras que ACEA  $10^{-11}$  M no mostró cambios significativos. La inhibición de la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA ocurrió con una concentración de ACEA de  $10^{-7}$  M, en un 36.05% y de  $5 \times 10^{-7}$  M con un 35.26%. La concentración  $10^{-8}$  M de ACEA provoca una ligera reducción (19.91%) en la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA aunque tal cambio no fue estadísticamente significativo con respecto del control.

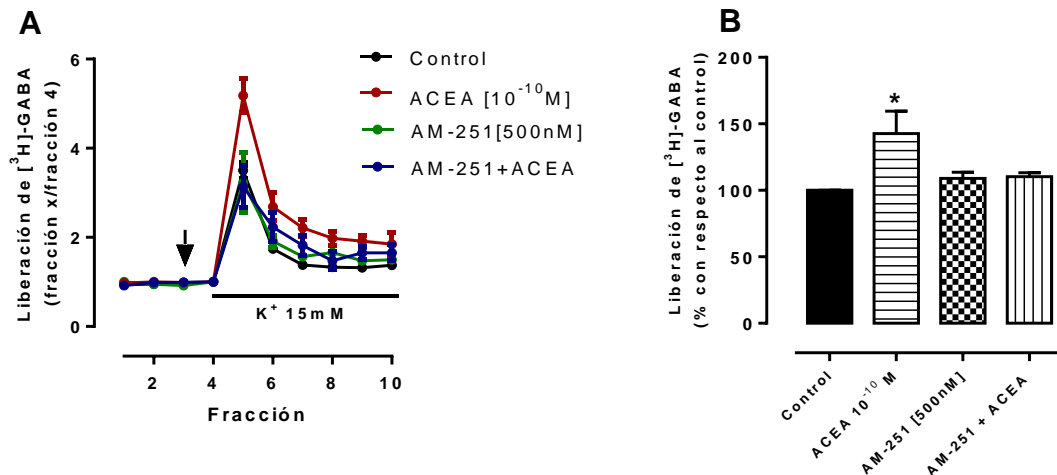


**Gráfica 1. El efecto bifásico del ACEA sobre la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA en rebanadas de SNr de rata depende de la concentración del agonista.** Concentraciones de  $10^{-10}$  M y de  $10^{-9}$  M de ACEA producen un aumento en la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA con respecto al control de 45 % y 54 %, respectivamente. Concentraciones del agonista de  $10^{-7}$  M y  $5 \times 10^{-7}$  M inhiben la liberación de [<sup>3</sup>H]-

GABA 36.05 % y 35.26%, respectivamente. ANOVA de 1 vía, Dunnet posthoc, \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ ,  $n = 3$ .

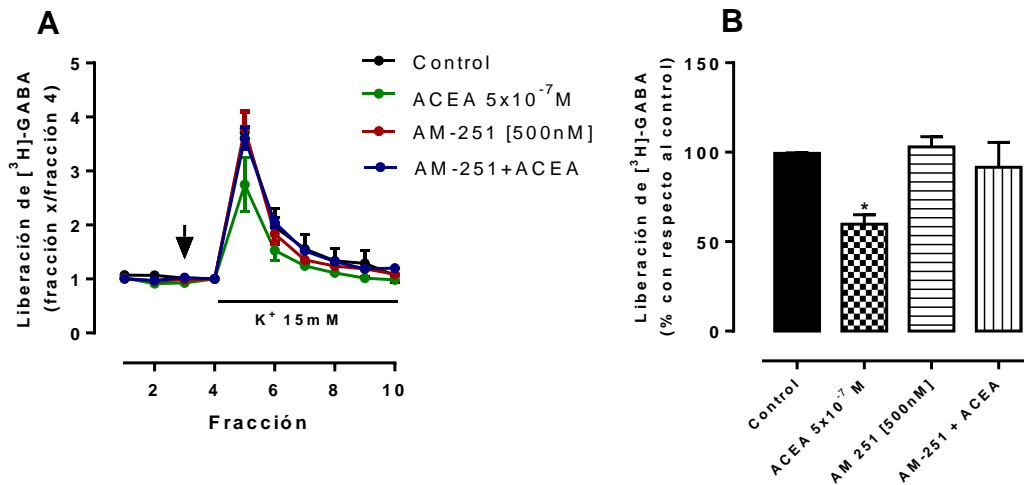
### b. El receptor CB1 es responsable del efecto facilitador e inhibidor de la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA mediado por ACEA

Para comprobar que el efecto facilitador de la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA observado a concentraciones bajas de ACEA se debía a la activación del receptor CB1, se evaluó el efecto que tiene el bloqueo de los receptores CB1 con el antagonista selectivo AM-251 [500nM]. La gráfica 2B muestra que el efecto facilitador de la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA producido por el agonista ACEA  $10^{-10}$ M se previene con el bloqueo del receptor CB1 por AM-251, lo cual sugiere que dicho efecto efectivamente requiere de la activación del receptor CB1.



**Gráfica 2. El receptor CB1 es responsable del aumento en la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA mediada por ACEA.** A) Experimento representativo del curso temporal de la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA en presencia o ausencia del antagonista del receptor CB1 AM-251 en rebanadas de la SNr despolarizadas con  $K^+$  [15 mM]. La flecha indica la administración del fármaco. B) El antagonista previene el efecto facilitador de la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA mediado por ACEA  $10^{-10}$ M, de 42.68% comparado a un 10.24% con respecto al control. ANOVA de 1 vía, Dunnet posthoc \* $p < 0.05$ ,  $n = 3$ .

En este contexto, también se determinó si el efecto inhibitorio de la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA por concentraciones altas de ACEA se debía a la activación del receptor CB1, para ello se utilizó al antagonista selectivo de este receptor, el AM-251 (500 nM), y se probó con una concentración de ACEA que produjese el efecto inhibitorio ( $5 \times 10^{-7}$  M). La gráfica 3B muestra como el bloqueo del receptor CB1 previene el efecto inhibitorio de la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA lo cual permite concluir que este efecto también depende de la activación de receptores CB1.

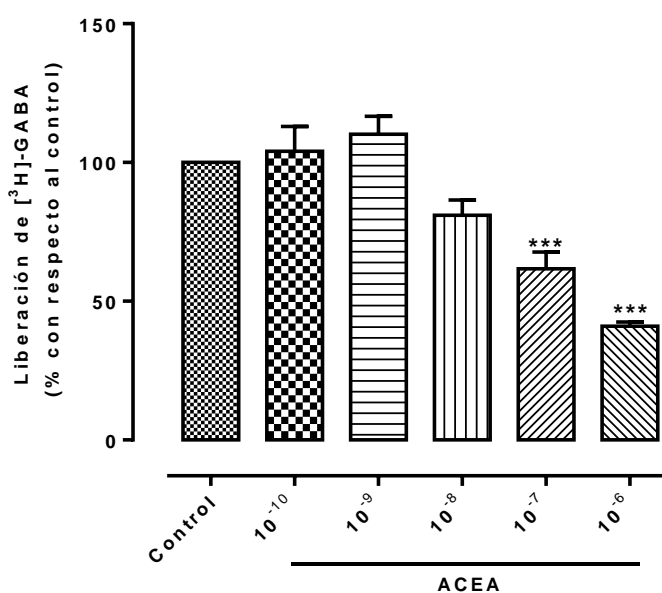


**Gráfica 3. El antagonista del receptor CB1 previene la inhibición de la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA en la SNr de rata inducida por ACEA 500 nM.** A) Experimento representativo del bloqueo de la inhibición de la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA por AM-251 en rebanadas de la SNr despolarizadas con K<sup>+</sup> 15 mM. La flecha indica la administración del fármaco. B) El antagonista previene el efecto inhibitorio de la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA mediado por ACEA  $5 \times 10^{-7}$  M (inhibición del 39.57% comparada con el control). ANOVA de 1 vía, Dunnet posthoc \* $p < 0.05$ ,  $n = 3$ .

### c. La dopamina endógena participa en el efecto facilitador de la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA mediado por ACEA

Para evaluar la participación de la dopamina endógena en el fenómeno observado en rebanadas de SNr tratadas con ACEA, se utilizaron ratas reserpinizadas. La reserpina es un inhibidor de la recaptura vesicular de catecolaminas que depleta la dopamina endógena de la rata (Garcia et al., 1997).

La gráfica 4 muestra que el efecto facilitador de la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA mediado por concentraciones bajas de ACEA ( $10^{-10}$ M y  $10^{-9}$ M) se previene en ratas pretratadas con reserpina, sin embargo, no afecta la inhibición inducida por concentraciones de ACEA mayores de  $10^{-8}$ M. Esto sugiere que la dopamina endógena es fundamental para que la activación del receptor CB1 genere aumento en la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA, más no participa en el efecto inhibitorio provocado clásicamente por el receptor CB1.

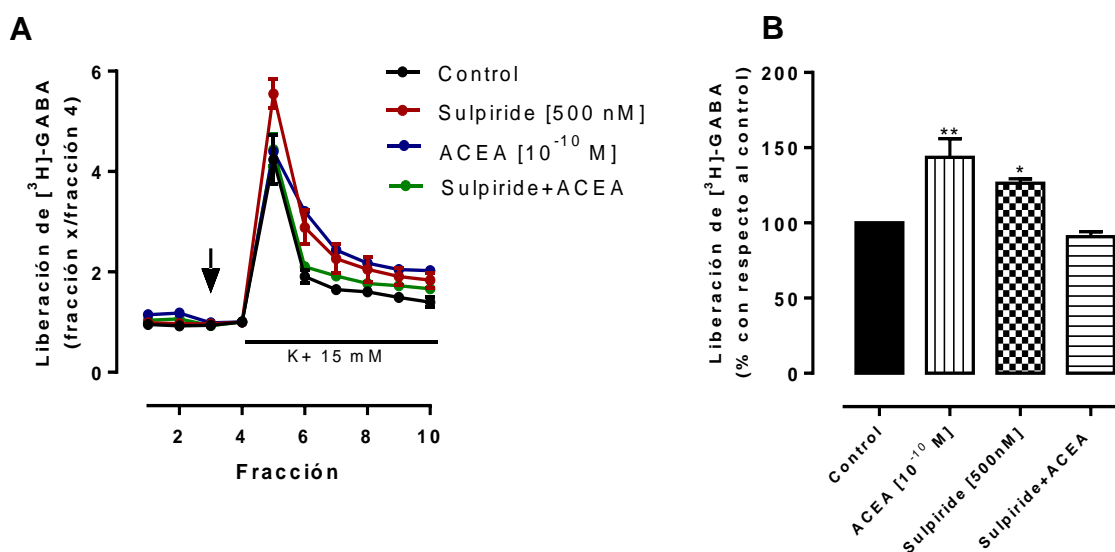


**Gráfica 4. El pretratamiento con reserpina previene el efecto facilitatorio de la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA mediada por ACEA en rebanadas de la SNr.** Concentraciones de ACEA de  $10^{-10}$ M y  $10^{-9}$ M que en ratas no tratadas facilitan la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA, en ratas reserpinizadas no generan ningún efecto (el aumento es del 4% para  $10^{-10}$ M y 10.2% para  $10^{-9}$ M con respecto al control), no obstante, la respuesta inhibitoria mediada por concentraciones de ACEA de  $10^{-8}$ M a  $10^{-6}$ M se mantiene intacta (inhibición de 19%, 38.33% y 59% respectivamente). ANOVA de 1 vía. Dunnet posthoc, \*\*\*  $p < 0.001$ ,  $n = 4$ .

**d. Los receptores de dopamina de la familia D2 participan en el efecto facilitatorio de la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA mediado por ACEA en la SNr de rata**

Después de observar que la dopamina endógena puede modificar el patrón de señalización clásico del receptor de cannabinoides CB1, se investigó el tipo de receptor de dopamina responsable de este fenómeno.

Se sabe que el efecto facilitador de la liberación de GABA mediado por el receptor CB1 requiere de la coactivación de receptores de dopamina que también están acoplados a proteínas Gi (Glass and Felder, 1997, Gonzalez et al., 2009). Por lo anterior, primero se evaluó el efecto que tienen los receptores de dopamina tipo D2 en la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA mediada por la activación del receptor CB1 en rebanadas de la SNr de rata, empleando al antagonista no selectivo de los receptores de dopamina tipo D2, Sulpiride (500nM). Se encontró que el antagonismo de estos receptores bloquea la facilitación de la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA provocada por ACEA 10<sup>-10</sup> M. Por otra parte, sulpiride (500nM) por sí solo facilita la liberación de este neurotransmisor, lo que sugiere que los receptores de dopamina tipo D2 son activados por la dopamina endógena en el momento de la despolarización.



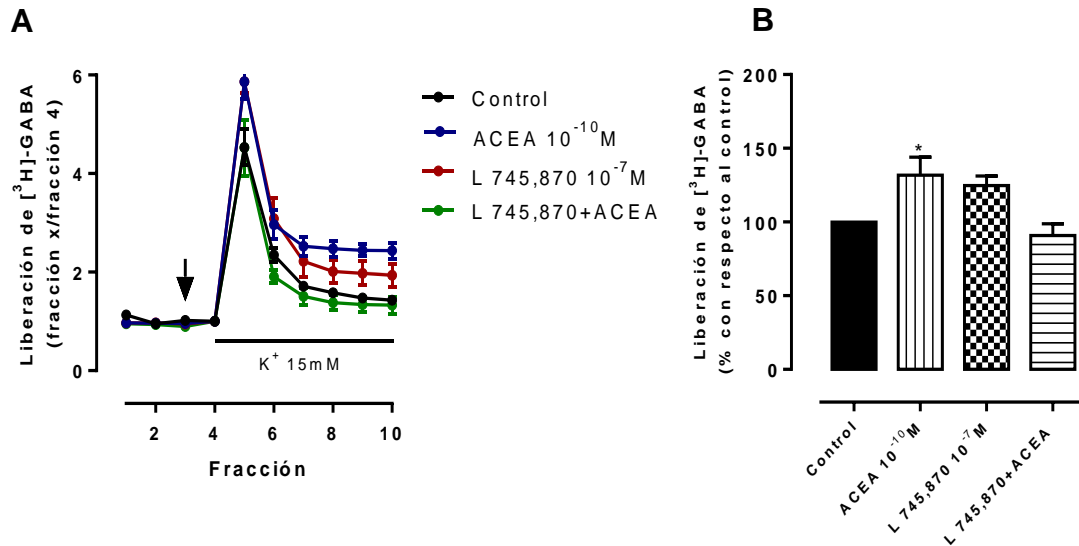
**Gráfica 5. Los receptores de dopamina tipo D2 participan en el efecto facilitador de la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA mediado por ACEA en rebanadas de SNr de rata. A) Experimento representativo de la inhibición de los receptores de dopamina tipo D2 con sulpiride y su efecto en la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA mediado por ACEA 10<sup>-10</sup>M, en rebanadas de SNr despolarizadas con K<sup>+</sup> 15 mM. La flecha indica la administración del fármaco. B) Sulpiride [500nM] antagoniza los receptores de**

dopamina tipo D2 facilitando la liberación del neurotransmisor (26.33% con respecto al control), sin embargo, cuando se coadministra con ACEA  $10^{-10}$ M bloquea la facilitación de la liberación de [ $^3$ H]-GABA mediada por el receptor CB1 (de 43.64% a 9.14% con respecto al control). ANOVA de 1 vía. Dunnet posthoc, \*\*  $p < 0.01$  y \*  $p < 0.05$ ,  $n = 4$ .

Los experimentos anteriores indican la participación de receptores de dopamina del tipo D2 en el efecto facilitador de la liberación de [ $^3$ H]-GABA mediado por la activación del receptor CB1 con ACEA. El siguiente paso a seguir fue determinar cuál de los tres subtipos de receptores de dopamina tipo D2 es activado por la dopamina endógena. En el caso de la SNr de rata, se ha postulado que la dopamina puede regular negativamente la liberación de GABA mediante la activación de receptores de dopamina D4 provenientes de terminales pálido-nigrales (Acosta-García et al., 2009), mientras que los receptores D3 participan en la potenciación de los efectos inducidos por los receptores D1 en terminales estriato-nigrales, más no tienen efecto sobre la liberación de GABA por sí solos (Cruz-Trujillo et al., 2013).

Las rebanadas de SNr de rata se incubaron en presencia o ausencia del antagonista selectivo del receptor D4, el L-745,870 ( $10^{-7}$ M). De acuerdo a la gráfica 6B, el bloqueo del receptor D4 o la activación del receptor CB1 con ACEA  $10^{-10}$ M muestran un aumento de la liberación de [ $^3$ H]-GABA, mientras que la coadministración de L-745,870 y ACEA  $10^{-10}$ M previene el aumento en liberación generado por cada fármaco. Estos datos sugieren que el efecto observado en la liberación de [ $^3$ H]-GABA a concentraciones bajas de ACEA requiere la activación conjunta de los receptores de dopamina D4 y del receptor de cannabinoides CB1 presentes en la SNr de la rata.



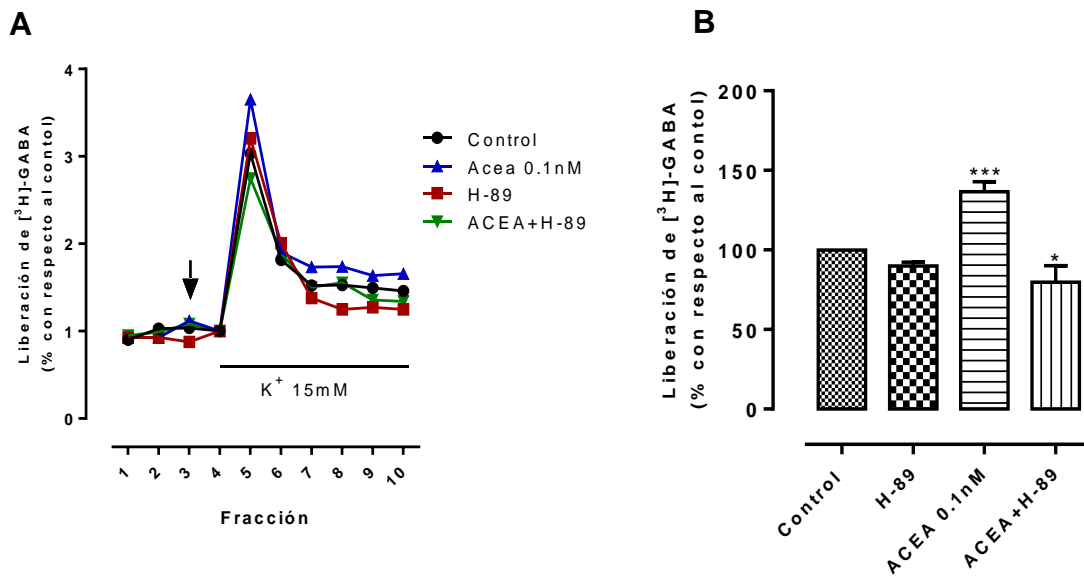


**Gráfica 6. Los receptores de dopamina D4 participan en el efecto facilitador de la liberación de  $[^3\text{H}]\text{-GABA}$  mediado por ACEA en rebanadas de SNr de rata.** A) Experimento representativo de la inhibición de los receptores de dopamina D4 con L-745,870 y su efecto en la liberación de  $[^3\text{H}]\text{-GABA}$  mediado por ACEA  $10^{-10}\text{M}$ . La flecha indica la administración del fármaco. B) El bloqueo del receptor D4 con el antagonista selectivo L-745,870 previene el efecto facilitador de la liberación de  $[^3\text{H}]\text{-GABA}$  mediado por concentraciones bajas de ACEA  $10^{-10}\text{M}$  (de 31.82% a 9.14%) y permite observar una ligera inhibición de la liberación de  $[^3\text{H}]\text{-GABA}$  del 24.72%. ANOVA de 1 vía. Dunnet posthoc, \*  $p < 0.05$ ,  $n = 4$ .

**e. El efecto facilitador de la liberación de  $[^3\text{H}]\text{-GABA}$  mediado por la activación del receptor CB1 requiere la activación de la PKA**

Es posible que la facilitación de liberación de  $[^3\text{H}]\text{-GABA}$  por la co-activación del receptor CB1 con concentraciones bajas de ACEA [0.1nM] y el receptor D4 por dopamina endógena se deba a un aumento en la formación de AMPc, como se ha mostrado cuando se coactivan los receptores CB1 y D2 (Glass and Felder, 1997). El aumento en la concentración de AMPc puede activar a la PKA, cinasa que favorece la liberación de GABA en el estriado y en la sustancia nigra pars reticulata de la rata (Arias-Montano et al., 2007). Por lo anterior, se evaluó la participación de la PKA en la liberación de  $[^3\text{H}]\text{-GABA}$  resultante de la coactivación de los receptores CB1 y D4 utilizando un inhibidor selectivo de la PKA, el H-89 (10  $\mu\text{M}$ ). El bloqueo de la actividad de la PKA con H-89 no produjo cambios apreciables con respecto al

valor control, indicando que tal proteína cinasa no tiene efecto tónico. Sin embargo, cuando se coadministró con ACEA [0.1nM] no sólo previno el aumento en la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA, también redujo un 20.28% la liberación con respecto a la condición control (gráfica 7B). Este resultado indica que la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA mediada por la coactivación de los receptores CB1 y D4 requiere de la activación de la PKA.



**Gráfica 7. El efecto facilitador de la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA mediado por ACEA requiere la activación de la PKA en rebanadas de SNr de rata.** A) Experimento representativo del bloqueo de la PKA con H-89 (10µM) y su efecto en la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA mediado por ACEA 10<sup>-10</sup>M tras la despolarización con K<sup>+</sup> 15mM. La flecha indica la administración del fármaco. B) La inhibición de la PKA bloquea la facilitación de la liberación de [3H]-GABA mediada por ACEA 10<sup>-10</sup>M e incluso reduce la liberación del neurotransmisor (de 36.92% a 20.28% por debajo del control). ANOVA de 1 vía. Dunnet posthoc, \*\*\* p<0.001 y \*p<0.05, n=3.

## VII. DISCUSIÓN

Los endocannabinoides son moduladores de la señalización neuronal, quienes a través de sus receptores, presentes a nivel presináptico, y del receptor CB1 promueven la inhibición de la neurotransmisión (Szabo et al., 2000, Kofalvi et al., 2005). Sin embargo, se ha observado que tales receptores pueden mediar respuestas diferentes a las ya conocidas, mismas que agregan complejidad a su función moduladora, como ocurre cuando se coactivan con los receptores de dopamina tipo D2 (Glass and Felder, 1997, Gonzalez et al., 2009). El descubrimiento de que este receptor tiene la capacidad de facilitar la señalización neuronal ha dado pie a estudios que buscan identificar qué condiciones se deben cumplir, así como el tipo de estructura cerebral dónde dicho evento puede suceder.

En este estudio realizado en rebanadas de la SNr de rata, se mostró que la activación del receptor CB1 con el agonista selectivo ACEA puede provocar dos efectos dependientes de la concentración, uno que facilitaba la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA por la aplicación de concentraciones bajas de 10<sup>-10</sup> M y 10<sup>-9</sup> M de ACEA, y otro, que deprimía la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA con concentraciones de 10<sup>-7</sup>M y 5x10<sup>-7</sup>M del agonista del receptor CB1 (gráfica 1). Estos resultados concuerdan con lo determinado en el Globo Pálido por González y colaboradores (2009), con la diferencia de que las concentraciones de ACEA que tales autores emplearon fueron mayores (concentraciones de 10<sup>-8</sup>M a 10<sup>-6</sup> M estimularon la liberación de neurotransmisor, mientras que concentraciones mayores lo inhibieron). Estas discrepancias entre las concentraciones podrían indicar diferencias en las afinidades de unión del agonista por los receptores CB1 presentes en núcleos diferentes. Esta propuesta concuerda con las evidencias obtenidas por Prather y colaboradores (2000), quienes muestran que el receptor CB1 puede ser activado por distintas concentraciones del agonista, las cuales pueden variar considerablemente según la región cerebral evaluada. Además, se mostró que este efecto bifásico dependiente de la concentración de ACEA fue resultado de la activación de los receptores CB1 porque la aplicación del antagonista selectivo AM-251 eliminó el efecto estimulador

de ACEA ( $10^{-10}$  M) y el efecto inhibitorio del mismo ACEA ( $5 \times 10^{-7}$  M) (gráfica 2B y 3B).

El efecto estimulador de la liberación de [ $^3$ H]-GABA en la SNr fue dependiente de dopamina endógena, al igual que ocurre en el globo pálido, ya que la reducción de la concentración de esta clase de dopamina con reserpina evitó que ACEA  $10^{-10}$  M y  $10^{-9}$  M facilitaran la liberación de [ $^3$ H]-GABA, sin afectar la respuesta inhibitoria mediada por concentraciones mayores de ACEA (gráfica 4). La participación de dopamina endógena para el efecto estimulador y no para el inhibidor sugiere que estas respuestas pueden ser generadas por poblaciones de receptores CB1 diferentes, probablemente provenientes de diferente origen neuronal. Así, se propone que una población de receptores CB1 podría encontrarse en la terminal palido-nigral, misma que es regulada por receptores de dopamina D4 (Acosta-Garcia et al., 2009), y sería responsable del efecto estimulador de la liberación de [ $^3$ H]-GABA; mientras que la otra población estaría presente en la terminal estriato-nigral, que es regulada por receptores de dopamina D1 y D3 (Cruz-Trujillo et al., 2013) y sería responsable del efecto inhibitorio observado.

El receptor de dopamina responsable del efecto mediado por dopamina endógena en el fenómeno estudiado fue evidenciado en el siguiente bloque de experimentos. El uso de sulpiride previno la facilitación de la liberación de [ $^3$ H]-GABA mediada por el receptor CB1 (gráfica 5B), lo cual indicó que la dopamina endógena está actuando a través de un receptor de dopamina de tipo D2. Además, la administración de sulpiride (500nM) también facilitó la liberación de [ $^3$ H]-GABA, y dado que la dopamina liberada estimula todo tipo de receptores presinápticos, el bloqueo de receptores tipo D2, que tónicamente inhiben la liberación de GABA, puede explicar el efecto facilitador de sulpiride.

Se ha postulado que la liberación de GABA en la SNr de la rata puede ser modulada por la activación de receptores de dopamina D4 (Acosta-Garcia et al., 2009), receptor que tiene una alta expresión en soma y las terminales de las neuronas palidales (Rivera et al., 2003). Dado que el bloqueo del receptor D4 con L-745,870 previno el efecto facilitador de la liberación de [ $^3$ H]-GABA, se propone que en la SNr la

dopamina endógena está activando a estos receptores y que ellos están mediando el efecto facilitador de la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA cuando los receptores CB1 son activados con concentraciones bajas del agonista. La respuesta obtenida con sulpiride y con L-745 es muy similar, sin embargo a diferencia de sulpiride, el bloqueo de los receptores D4 con L-745 no mostró diferencias significativas en la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA con respecto al control, aunque puede verse una tendencia en la facilitación de la liberación lo cual puede atribuirse a variaciones entre los experimentos.

Finalmente, se encontró que la vía de señalización involucrada con la facilitación de la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA es la AC-AMPC-PKA. Para evidenciar la participación de esa proteína en la vía, se decidió utilizar un inhibidor selectivo de la PKA, el H-89. El bloqueo de la PKA con H-89 no sólo previno el efecto facilitador de la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA mediado por ACEA 10<sup>-10</sup>M, también redujo un 20.28% la liberación comparada con la condición control. De esta forma, la coactivación de los receptores de dopamina D4 y los receptores CB1 producirían un cambio en la señalización celular que involucraría el aumento de la acumulación de AMPC, probablemente a través de la activación de una proteína Gs, con la consecuente activación de la PKA. La cascada de señalización desencadenaría un aumento de las concentraciones de calcio intracelular (Obrietan and van den Pol, 1997, Arias-Montano et al., 2007), lo que facilitaría la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA en las rebanadas de la SNr de la rata.

La explicación de este cambio de señalización aún está en debate. La formación de heterodímeros es una propuesta del por qué ocurre dicho cambio, como ocurre con la formación de heterodímeros entre CB1 y D2 (Matyas et al., 2006, Khan and Lee, 2014). Sin embargo, hasta el momento se descarta una posible interacción entre los receptores CB1 y D4 debido a que en estudios in silico e in vitro no han mostrado una posible dimerización de este par de receptores (Callen et al., 2012). Es posible que los cambios observados en la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA en la SNr se deban a un cambio de acople del receptor CB1 por proteínas Gs, similar al que ocurre en el Globo Pálido. Bajo este contexto, la activación del receptor de dopamina D4 generaría un déficit de proteínas Gi, quienes ya no estarían disponibles para el receptor CB1, produciendo el cambio de acople de este receptor a proteínas Gs (Gonzalez et al., 2009; Glass and

Felder, 1997). El hecho de que el receptor CB1 pueda acoplarse a proteínas Gs ha sido atribuido a sitios específicos responsables del reconocimiento, acople y eficiencia de activación de las proteínas G. Se ha sugerido que la segunda y tercera asa intracelular del receptor CB1 está involucrada con la interacción con proteínas Gs, mientras que un dominio altamente conservado en la cola proximal C-terminal (“Helix 8”) participa en mantener la actividad basal y en cambiar las conformaciones activas del receptor. No obstante, el cambio de acople de la proteína G en el receptor CB1 es dado por el aminoácido L222 presente en un motivo altamente conservado en el asa intracelular 2 (DRY(X)<sub>5</sub>PL). La mutación de este aminoácido impide el acople de la proteína Gs con la consecuente falta de acumulación de AMPc (Chen et al., 2010).

El efecto estimulador por la activación del receptor CB1 puede ser un mecanismo alternativo de señalización bajo condiciones en que las proteínas Gi están acopladas a otros GPCR en ciertos microdominios celulares. Resulta interesante que el efecto facilitador de ACEA observado a concentraciones nanomolares se acerca a la Ki del receptor para ACEA (Ki=1.4nM). Es posible que los receptores de dopamina D4 y de cannabinoides CB1 muestren afinidades diferentes por las proteínas Gi, de tal forma que el acople de estas proteínas con D4 se vea favorecido sobre el acople con CB1. Se ha mostrado que lo anterior ocurre con los receptores CB1 y D2 en un sistema de expresión heterólogo, en cuyo caso la activación del receptor CB1 facilita la acumulación de AMPc, mientras que se requiere la sobreexpresión de proteínas Gi en este mismo sistema para observar el efecto inhibitorio en la acumulación de AMPc tras la activación del receptor CB1 (Jarrahian et al., 2004). Adicionalmente, se ha visto que el mismo tipo de agonista de cannabinoides (WIN-55212-2) puede activar diferentes subtipos de subunidades Gα con varios grados de eficacia y potencia y cabe resaltar que las concentraciones empleadas para activar a las diferentes proteínas Gα se encuentran por arriba y por abajo de los valores generales de EC<sub>50</sub> para estimular la unión de [35S]GTPγS y [32P]AA-GTP (Prather et al., 2000). Con base a estas evidencias, nuestros resultados sugieren que el receptor D4 activado por dopamina endógena probablemente tiene una mayor afinidad por las proteínas Gi con

respecto al receptor CB1, lo cual generaría un cambio de acople a proteínas Gs y la consecuente facilitación de la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA en la SNr de la rata.

Con lo anterior, se pudo probar que en rebanadas de SNr ocurre el efecto facilitador de la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA mediado por la activación de los receptores CB1 con concentraciones bajas de ACEA y la activación de los receptores D4 por la dopamina endógena, mismo que involucra la activación de la vía de señalización AC-AMPC-PKA. La significancia fisiológica de la respuesta bifásica dada por la activación de los receptores de cannabinoides CB1 aún no ha sido determinada, y aunque el acople del receptor a proteínas Gi/o es el que ocurre comúnmente, pueden existir ciertas situaciones donde predominan el acople alternativo, ya sea por un desbalance natural de las proteínas G de un tipo celular particular, a través del secuestro de proteínas Gi por otros receptores colocalizados en la célula o por diferencias en la eficacia en el acople de proteínas G (Calandra et al., 1999).

## VIII. CONCLUSIONES

- La activación del receptor CB1 puede estimular o inhibir la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA en la SNr de rata.
- El efecto estimulador de la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA mediada por la activación de CB1 es dependiente de dopamina endógena.
- El receptor de dopamina D4 es activado por dopamina endógena y participa en el efecto facilitador de la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA mediado por CB1.
- El aumento de la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA depende de la activación de la PKA.

## IX. PERSPECTIVAS

- Dilucidar la existencia de las dos poblaciones de receptores CB1 en la SNr con origen neuronal distinto.
- Determinar la co-expresión del receptor CB1 y D4 en la vía pálido-nigral.
- Determinar si el aumento en la liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA por la co-activación de los receptores CB1 y D4 depende de una proteína  $G\alpha_{olf/s}$



## X. BIBLIOGRAFÍA

- ACOSTA-GARCIA, J., HERNANDEZ-CHAN, N., PAZ-BERMUDEZ, F., SIERRA, A., ERLIJ, D., ACEVES, J. & FLORAN, B. 2009. D4 and D1 dopamine receptors modulate [3H] GABA release in the substantia nigra pars reticulata of the rat. *Neuropharmacology*, 57, 725-30.
- ANDERSEN, P. H., GINGRICH, J. A., BATES, M. D., DEARRY, A., FALARDEAU, P., SENOGLES, S. E. & CARON, M. G. 1990. Dopamine receptor subtypes: beyond the D1/D2 classification. *Trends Pharmacol Sci*, 11, 231-6.
- ARIAS-MONTANO, J. A., FLORAN, B., FLORAN, L., ACEVES, J. & YOUNG, J. M. 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, 310-9.
- BEAULIEU, J. M. & GAINETDINOV, R. R. 2011. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev*, 63, 182-217.
- BOYES, J. & BOLAM, J. P. 2007. Localization of GABA receptors in the basal ganglia. *Prog Brain Res*, 160, 229-43.
- CALANDRA, B., PORTIER, M., KERNEIS, A., DELPECH, M., CARILLON, C., LE FUR, G., FERRARA, P. & SHIRE, D. 1999. Dual intracellular signaling pathways mediated by the human cannabinoid CB1 receptor. *Eur J Pharmacol*, 374, 445-55.
- CALLEN, L., MORENO, E., BARROSO-CHINEA, P., MORENO-DELGADO, D., CORTES, A., MALLOL, J., CASADO, V., LANCIEGO, J. L., FRANCO, R., LLUIS, C., CANELA, E. I. & MCCORMICK, P. J. 2012. Cannabinoid receptors CB1 and CB2 form functional heteromers in brain. *J Biol Chem*, 287, 20851-65.
- CONSOLE-BRAM, L., MARCU, J. & ABOOD, M. E. 2012. Cannabinoid receptors: nomenclature and pharmacological principles. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 38, 4-15.
- CRAGG, S. J., NICHOLSON, C., KUME-KICK, J., TAO, L. & RICE, M. E. 2001. Dopamine-mediated volume transmission in midbrain is regulated by distinct extracellular geometry and uptake. *J Neurophysiol*, 85, 1761-71.
- CRUZ-TRUJILLO, R., AVALOS-FUENTES, A., RANGEL-BARAJAS, C., PAZ-BERMUDEZ, F., SIERRA, A., ESCARTIN-PEREZ, E., ACEVES, J., ERLIJ, D. & FLORAN, B. 2013. D3 dopamine receptors interact with dopamine D1 but not D4 receptors in the GABAergic terminals of the SNr of the rat. *Neuropharmacology*, 67, 370-8.
- CHEN, X. P., YANG, W., FAN, Y., LUO, J. S., HONG, K., WANG, Z., YAN, J. F., CHEN, X., LU, J. X., BENOVIC, J. L. & ZHOU, N. M. 2010. Structural determinants in the second intracellular loop of the human cannabinoid CB1 receptor mediate selective coupling to G(s) and G(i). *Br J Pharmacol*, 161, 1817-34.
- CHERUBINI, E. & CONTI, F. 2001. Generating diversity at GABAergic synapses. *Trends Neurosci*, 24, 155-62.
- DE PETROCELLIS, L. & DI MARZO, V. 2010. Non-CB1, Non-CB2 Receptors for Endocannabinoids, Plant Cannabinoids, and Synthetic Cannabimimetics: Focus on G-protein-coupled Receptors and Transient Receptor Potential Channels. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 5, 103-121.
- DENIAU, J. M., MAILLY, P., MAURICE, N. & CHARPIER, S. 2007. The pars reticulata of the substantia nigra: a window to basal ganglia output. *Prog Brain Res*, 160, 151-72.
- DI MARZO, V., BIFULCO, M. & DE PETROCELLIS, L. 2004. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov*, 3, 771-84.

- DI MARZO, V., HILL, M. P., BISOGNO, T., CROSSMAN, A. R. & BROTCHE, J. M. 2000. Enhanced levels of endogenous cannabinoids in the globus pallidus are associated with a reduction in movement in an animal model of Parkinson's disease. *FASEB J*, 14, 1432-8.
- FITZGERALD, M. L., SHOBIN, E. & PICKEL, V. M. 2012. Cannabinoid modulation of the dopaminergic circuitry: implications for limbic and striatal output. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 38, 21-9.
- FLORAN, B., FLORAN, L., ERLIJ, D. & ACEVES, J. 2004. Activation of dopamine D4 receptors modulates [3H]GABA release in slices of the rat thalamic reticular nucleus. *Neuropharmacology*, 46, 497-503.
- GARCIA, M., FLORAN, B., ARIAS-MONTANO, J. A., YOUNG, J. M. & ACEVES, J. 1997. Histamine H3 receptor activation selectively inhibits dopamine D1 receptor-dependent [3H]GABA release from depolarization-stimulated slices of rat substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience*, 80, 241-9.
- GLASS, M. & FELDER, C. C. 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, 5327-33.
- GONZALEZ, B., PAZ, F., FLORAN, L., ACEVES, J., ERLIJ, D. & FLORAN, B. 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, 822-8.
- GUATTEO, E., CUCCHIARONI, M. L. & MERCURI, N. B. 2009. Substantia nigra control of basal ganglia nuclei. *J Neural Transm Suppl*, 91-101.
- HERKENHAM, M., LYNN, A. B., DE COSTA, B. R. & RICHFIELD, E. K. 1991a. Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat. *Brain Res*, 547, 267-74.
- HERKENHAM, M., LYNN, A. B., JOHNSON, M. R., MELVIN, L. S., DE COSTA, B. R. & RICE, K. C. 1991b. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci*, 11, 563-83.
- HERMANN, H., MARSICANO, G. & LUTZ, B. 2002. Coexpression of the cannabinoid receptor type 1 with dopamine and serotonin receptors in distinct neuronal subpopulations of the adult mouse forebrain. *Neuroscience*, 109, 451-60.
- HO, B. Y., UEZONO, Y., TAKADA, S., TAKASE, I. & IZUMI, F. 1999. Coupling of the expressed cannabinoid CB1 and CB2 receptors to phospholipase C and G protein-coupled inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels. *Receptors Channels*, 6, 363-74.
- HOHMANN, A. G. & HERKENHAM, M. 1999. Cannabinoid receptors undergo axonal flow in sensory nerves. *Neuroscience*, 92, 1171-5.
- HOWLETT, A. C., BARTH, F., BONNER, T. I., CABRAL, G., CASELLAS, P., DEVANE, W. A., FELDER, C. C., HERKENHAM, M., MACKIE, K., MARTIN, B. R., MECHOULAM, R. & PERTWEE, R. G. 2002. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev*, 54, 161-202.
- HOWLETT, A. C. & MUKHOPADHYAY, S. 2000. Cellular signal transduction by anandamide and 2-arachidonoylglycerol. *Chem Phys Lipids*, 108, 53-70.
- JARBE, T. U., LEMAY, B. J., HALIKHEDKAR, A., WOOD, J., VADIVEL, S. K., ZVONOK, A. & MAKRIYANNIS, A. 2014. Differentiation between low- and high-efficacy CB1 receptor agonists using a drug discrimination protocol for rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 231, 489-500.
- JARRAHIAN, A., WATTS, V. J. & BARKER, E. L. 2004. D2 dopamine receptors modulate G<sub>α</sub>-subunit coupling of the CB1 cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, 308, 880-6.

- KEARN, C. S., BLAKE-PALMER, K., DANIEL, E., MACKIE, K. & GLASS, M. 2005. Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors enhances heterodimer formation: a mechanism for receptor cross-talk? *Mol Pharmacol*, 67, 1697-704.
- KHAN, S. S. & LEE, F. J. 2014. Delineation of domains within the cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors that mediate the formation of the heterodimer complex. *J Mol Neurosci*, 53, 10-21.
- KOFALVI, A., RODRIGUES, R. J., LEDENT, C., MACKIE, K., VIZI, E. S., CUNHA, R. A. & SPERLAGH, B. 2005. Involvement of cannabinoid receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rodent striatum: a combined immunochemical and pharmacological analysis. *J Neurosci*, 25, 2874-84.
- LAUCKNER, J. E., JENSEN, J. B., CHEN, H. Y., LU, H. C., HILLE, B. & MACKIE, K. 2008. GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 2699-704.
- MACCARRONE, M., DAINESE, E. & ODDI, S. 2010. Intracellular trafficking of anandamide: new concepts for signaling. *Trends Biochem Sci*, 35, 601-8.
- MACCARRONE, M., GUBELLINI, P., BARI, M., PICCONI, B., BATTISTA, N., CENTONZE, D., BERNARDI, G., FINAZZI-AGRO, A. & CALABRESI, P. 2003. Levodopa treatment reverses endocannabinoid system abnormalities in experimental parkinsonism. *J Neurochem*, 85, 1018-25.
- MACKIE, K. & STELLA, N. 2006. Cannabinoid receptors and endocannabinoids: evidence for new players. *AAPS J*, 8, E298-306.
- MALASPINA, P., PICKLO, M. J., JAKOBS, C., SNEAD, O. C. & GIBSON, K. M. 2009. Comparative genomics of aldehyde dehydrogenase 5a1 (succinate semialdehyde dehydrogenase) and accumulation of gamma-hydroxybutyrate associated with its deficiency. *Hum Genomics*, 3, 106-20.
- MATYAS, F., YANOVSKY, Y., MACKIE, K., KELSCH, W., MISGELD, U. & FREUND, T. F. 2006. Subcellular localization of type 1 cannabinoid receptors in the rat basal ganglia. *Neuroscience*, 137, 337-61.
- OBRIETAN, K. & VAN DEN POL, A. N. 1997. GABA activity mediating cytosolic Ca<sup>2+</sup> rises in developing neurons is modulated by cAMP-dependent signal transduction. *J Neurosci*, 17, 4785-99.
- ONG, W. Y. & MACKIE, K. 1999. A light and electron microscopic study of the CB1 cannabinoid receptor in primate brain. *Neuroscience*, 92, 1177-91.
- OORSCHOT, D. E. 1996. Total number of neurons in the neostriatal, pallidal, subthalamic, and substantia nigral nuclei of the rat basal ganglia: a stereological study using the cavalieri and optical disector methods. *J Comp Neurol*, 366, 580-99.
- OWENS, D. F. & KRIEGSTEIN, A. R. 2002. Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci*, 3, 715-27.
- PERTWEE, R. G. 2005. Pharmacological actions of cannabinoids. *Handb Exp Pharmacol*, 1-51.
- PERTWEE, R. G. 2006. The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: an overview. *Int J Obes (Lond)*, 30 Suppl 1, S13-8.
- PRATHER, P. L., MARTIN, N. A., BREIVOGEL, C. S. & CHILDERS, S. R. 2000. Activation of cannabinoid receptors in rat brain by WIN 55212-2 produces coupling to multiple G protein alpha-subunits with different potencies. *Mol Pharmacol*, 57, 1000-10.
- RICE, M. E., PATEL, J. C. & CRAGG, S. J. 2011. Dopamine release in the basal ganglia. *Neuroscience*, 198, 112-37.
- RIVERA, A., TRIAS, S., PENAFIEL, A., ANGEL NARVAEZ, J., DIAZ-CABIALE, Z., MORATALLA, R. & DE LA CALLE, A. 2003. Expression of D4 dopamine

- receptors in striatonigral and striatopallidal neurons in the rat striatum. *Brain Res*, 989, 35-41.
- ROMMELFANGER, K. S. & WICHMANN, T. 2010. Extrastriatal dopaminergic circuits of the Basal Ganglia. *Front Neuroanat*, 4, 139.
- SCHOUSBOE, A. & WAAGEPETERSEN, H. S. 2007. GABA: homeostatic and pharmacological aspects. *Prog Brain Res*, 160, 9-19.
- SERPA, A., CORREIA, S., RIBEIRO, J. A., SEBASTIAO, A. M. & CASCALHEIRA, J. F. 2015. The combined inhibitory effect of the adenosine A1 and cannabinoid CB1 receptors on cAMP accumulation in the hippocampus is additive and independent of A1 receptor desensitization. *Biomed Res Int*, 2015, 872684.
- STELLA, N. 2010. Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas. *Glia*, 58, 1017-30.
- SVIZENSKA, I., DUBOVY, P. & SULCOVA, A. 2008. Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures--a short review. *Pharmacol Biochem Behav*, 90, 501-11.
- SZABO, B., WALLMICHATH, I., MATHONIA, P. & PFREUNDTNER, C. 2000. Cannabinoids inhibit excitatory neurotransmission in the substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience*, 97, 89-97.
- TEPPER, J. M., ABERCROMBIE, E. D. & BOLAM, J. P. 2007. Basal ganglia macrocircuits. *Prog Brain Res*, 160, 3-7.
- TIBERI, M., JARVIE, K. R., SILVIA, C., FALARDEAU, P., GINGRICH, J. A., GODINOT, N., BERTRAND, L., YANG-FENG, T. L., FREMEAU, R. T., JR. & CARON, M. G. 1991. Cloning, molecular characterization, and chromosomal assignment of a gene encoding a second D1 dopamine receptor subtype: differential expression pattern in rat brain compared with the D1A receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 7491-5.
- TSOU, K., BROWN, S., SANUDO-PENA, M. C., MACKIE, K. & WALKER, J. M. 1998. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 83, 393-411.
- VALLONE, D., PICETTI, R. & BORRELLI, E. 2000. Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev*, 24, 125-32.
- VAN BOCKSTAELE, E. J. 2012. Cannabinoid receptor signaling and modulation of monoamines: implications for psychiatric and neurological disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 38, 1-3.
- WINDELS, F. & KIYATKIN, E. A. 2006. Dopamine action in the substantia nigra pars reticulata: iontophoretic studies in awake, unrestrained rats. *Eur J Neurosci*, 24, 1385-94.