



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL.

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**Estudio electrofisiológico de la coactivación de la familia de receptores
D2 y CB1 en el Globo pálido y su efecto sobre la liberación de GABA.**

T E S I S

Que presenta

Israel Octavio Conde Rojas

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Benjamín Floran Garduño

México, D.F.

Agosto, 2015

Este trabajo se realizó gracias a un donativo de Maestría otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número **152326**, en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) en el departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias.

AGRADECIMIENTOS.

Ante todo quiero expresar mi agradecimiento a mis padres, José Roberto Octavio Conde Carmona y Guadalupe Rojas Bada, mil palabras no bastaría para agradecerles una vida de sacrificio y esfuerzo, espero que este objetivo logrado lo sientan como suyo pues la fuerza que me ayudo a conseguirlo siempre fue su apoyo y cariño incondicional. A ustedes mi eterna admiración.

A mis hermanos. David, Maria del Pilar y Roberto. A mis pequeños sobrinos Grace y a Elian por estar incondicionalmente todos estos años.

Quiero agradecer al Dr Benjamin Floran Garduño por la oportunidad que me brindo al aceptarme en su equipo de trabajo en del laboratorio de neurofarmacología del departamento de fisiología biofísica y Neurociencias, haciendo posible mi contacto con el mundo de la investigación básica y sobre todo por su apoyo, consejos y amistad brindada.

A mis amigos y compañeros del laboratorio, les agradezco el apoyo recibido a lo largo del periodo de experimentación y a sus enseñanzas a lo referente a aspectos tecnicos e informaticos .

A mis amigos de la generación 2013-2015 por los momentos inolvidables y experiencias que compartimos durante nuestro aprendizaje.

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS	6
2. RESUMEN	8
3. ABSTRACT	9
4. ANTECEDENTES GENERALES	10
4.1 LOS ENDOCANABINOIDES.....	10
4.1.1 <i>SÍNTESIS Y METABOLISMO</i>	11
4.1.2 <i>RECEPTORES A CANABINOIDES</i>	13
4.1.3 <i>EXPRESIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE RECEPTORES CB1</i>	13
4.1.4 <i>SEÑALIZACIÓN</i>	14
4.1.5 <i>ACCIÓN SINÁPTICA DE LOS CANABINOIDES</i>	15
4.1.5.1 <i>MECANISMO POSTSINÁPTICO</i>	16
4.1.5.2 <i>MECANISMOS PRESINÁPTICOS</i>	17
4.1.6 <i>FUNCIÓN DE LOS RECEPTORES CB1 EN GANGLIOS BASALES</i>	18
4.2 GANGLIOS BASALES.....	19
4.2.1 <i>EL GLOBO PÁLIDO EXTERNO</i>	21
4.2.2 <i>LA DOPAMINA EN LA VÍA INDIRECTA</i>	23
4.2.3 <i>EXPRESIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LOS RECEPTORES D2</i>	24
4.2.3.1 <i>SEÑALIZACIÓN</i>	25
5. ANTECEDENTES INMEDIATOS	26
6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
7. HIPÓTESIS	30
8. OBJETIVO GENERAL	31
9. OBJETIVOS PARTICULARES	31
10. MATERIAL Y MÉTODOS	32
10.1 OBTENCIÓN DE REBANADAS	32
10.2 SOLUCIONES.....	34
10.3 REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO.....	36
10.3.1 <i>Pipetas</i>	36
10.3.2 <i>Registro</i>	36
10.3.3 <i>Corrientes espontáneas inhibitorias</i>	37
10.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	39
11. RESULTADOS	40
11.1 IDENTIFICACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DE LAS NEURONAS DEL GLOBO PÁLIDO EXTERNO.....	40
11.2 IDENTIFICACIÓN DE LAS CORRIENTES POSTSINÁPTICAS INHIBITORIAS ESPONTÁNEAS DEL GLOBO PÁLIDO EXTERNO.	43
11.3 EFECTO DEL DSI BAJO CONDICIONES DE ALTO Y BAJO QUELANTE DE Ca^{2+}	45
11.4 EFECTO DE LOS ENDOCANABINOIDES Y RECEPTORES CB1 SOBRE LA FRECUENCIA DE LAS IPSCS ESPONTÁNEAS EN NEURONAS DEL GPE.....	50
11.5 LA COACTIVACIÓN DE RECEPTORES DE LA FAMILIA D2 Y CB1 PREVIENE EL EFECTO INHIBITORIO DE LOS ENDOCANABINOIDES EN EL GPE.....	54

11.6	LA RESPUESTA FACILITATORIA DE LAS IPSCs POR LA COACTIVACIÓN DE RECEPTORES DE LA FAMILIA D2 Y CB1 DEPENDEN DE INCREMENTOS EN LA ACTIVIDAD DE PKA.....	59
11.7	LA COACTIVACIÓN DE RECEPTORES CB1 Y D4 DE LAS RECURRENTE COLATERALES DEL GPe PREVIENEN EL EFECTO DE LOS ENDOCANABINOIDES.	62
12.	DISCUSIÓN	64
12.1	EFECTO DE LA CONCENTRACION DE CALCIO INTRACELULAR EN LA RESPUESTA MEDIADA POR ENDOCANABINOIDES.....	64
12.2	LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES CB1 Y D4 INHIBEN LA FRECUENCIA DE LAS IPSCs ESPONTÁNEAS EN NEURONAS DEL GPe.....	67
12.3	LA COACTIVACION DE RECEPTORES CB1 Y D4 CONVIERTE LA RESPUETA INHIBITORIA EN ESTIMULATORIA A TRAVES DE LA VIA ADENILIL CICLASA→AMPC →PKA 68	
13.	CONCLUSIONES	71
14.	BIBLIOGRAFÍA	72

1. ABREVIATURAS

eCBs	endocannabinoides
2-AG	2-araquidonoilglicerol
AArG	sn-1-acil-2- araquinodil-glicerol
AC	Adenilato ciclase
AEA	N-arachidonoylethanolamine
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
AMPC	3', 5'-adenosinmonofosfato
CaCl ₂	Cloruro de Calcio
CB1	Receptor a cannabinoides tipo 1
CB2	Receptor a cannabinoides tipo 2
CHO	Células de ovario de hámster chino
CNQX	6 ciano-7-nitroquinoxalin-2,3 diona
CsCl	Cloruro de Cesio
CsOH	Hidróxido de Cesio
DA	Dopamina
DAGL	Diacilglicerol lipasa
DSE	Supresión de la excitación por despolarización
DSI	Supresión de la inhibición por despolarización
EP	Enfermedad de Parkinson
FAAH-1	Hidrolasa de ácidos grasos-1
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GB	Ganglios basales
GIRK	Canales de potasio de rectificación entrante
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G
GPe	Globo pálido externo
GPI	Globo pálido interno
GTP	Guanosín trifosfato
G Ω	Giga Ohmio
HEPES	2- [4- (2-hidroxietil) piperazin-1-il] etanosulfónico
IPSCs	Corrientes postsinápticas inhibitorias

KCl	Cloruro de Potasio
KH ₂ PO ₄	Fosfato de Potasio monobásico
KHz	Kilohertzios
KOH	Hidróxido de Potasio
MAGL	Lipasa monoacilglicerol
MAPK	Cinasa activada por mitógenos
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
mGluRs	Receptores metabotrópicos a glutamato
MΩ	Mega Ohmio
NaCl	Cloruro de Sodio
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sodio
NAPE	N-acyl phosphatidylethanolamine
NAPE-PLD	Fosfodiesterasa del tipo fosfolipasa D
NAT	N-aciltransferasa
NMDA	N-metil-D-aspartato
nST	Núcleo subtalámico
PE	Fosfatidiletanolamina
PKA	Quinasa dependiente de AMPc
PTX	Toxina de Bordetella pertussis
SNc	Sustancia negra pars compacta
SNC	Sistema Nervioso Central
SNr	Sustancia negra pars reticulada
STr	Estriado
THC	Δ ⁹ tetrahidrocannabinol

2. RESUMEN

La coactivación de receptores D2-like y cannabinoides tipo CB1 estimula la liberación de GABA en el Globo Pálido en tanto que la activación por separado la inhibe. Esto sugiere un nuevo mecanismo mediado por pares de receptores presinápticos para el control de la liberación de neurotransmisores y procesos de dimerización. Para ahondar en el mecanismo por el cual se produce este efecto, estudiamos la coactivación de los receptores D4 (presentes en el núcleo) y CB1 en el control de la liberación de GABA del Globo Pálido del ratón y la probable vía de señalización que media su efecto.

Realizamos experimentos electrofisiológicos en rebanadas de Globo Pálido de ratón de 12 a 14 días de nacidos bajo la técnica de fijación de voltaje en la modalidad de célula completa registrando corrientes postsinápticas espontáneas GABAérgicas (sIPSC). La activación de los receptores CB1 se realizó mediante endocannabinoides sintetizados y liberados con el protocolo DSI (supresión de la inhibición por despolarización).

El DSI, produjo una disminución de la frecuencia de las IPSCs la cual fue antagonizada por el AM 251, un antagonista selectivo de los receptores CB1. La coactivación de los receptores CB1 por DSI y D4 con Quinpirol, que por sí mismo también inhibe la frecuencia de las IPSCs, aumentó la frecuencia de las IPSCs aún por encima del control. El efecto fué bloqueado por el L 745,870, un antagonista selectivo de los receptores D4. El bloqueo de la PKA con H89, previno el efecto facilitatorio de la coactivación sugiriendo la participación de esta cinasa en el efecto. Estos datos sugieren que la coactivación de receptores D4 y CB1 de las recurrentes colaterales del Globo Pálido, estimula la liberación de GABA por un incremento en la formación de AMPc y activación de la PKA.

1. ABSTRACT

The co-activation of D2 like receptors and cannabinoid receptors type CB1 stimulates the release of GABA in the globus pallidus while separately they inhibit it. This suggests a new mechanism involving two presynaptic receptors for controlling the release of neurotransmitters and dimerization processes. To delve into the mechanism by which this effect occurs, we studied the co-activation of the D4 receptor (in the nucleus) and CB1 in controlling the release of GABA from the globus pallidus mouse and likely signaling pathway that mediates its effect.

We conducted electrophysiological experiments in slices of mouse globus pallidus 12-14 days old under voltage clamp technique. In whole-cell recording mode spontaneous postsynaptic GABAergic current (IPSCs) were recorded. To evoke the Synthesis and release of endocannabinoids were induced by performing we perform DSI protocol (suppression of inhibition by depolarization) to activate presynaptic CB1 receptors.

The DSI produced a decrease in the frequency of IPSCs that was antagonized by the AM 251, a selective antagonist of CB1 receptors. Co-activation of CB1 receptors and D4 with quinpirole, which itself also inhibits the IPSC frequency, increased frequency of these above the control. The effect was blocked by the L 745,870, a selective D4 receptor antagonist. In addition, blocking PKA with H89 prevented the facilitatory effect of coactivation suggesting the involvement of this kinase. These data suggest that co-activation of CB1-D4 in recurrent collaterals of globus pallidus receptors, stimulates the GABA release by increasing the synthesis of cAMP and activation of PKA.

2. ANTECEDENTES GENERALES

2.1 LOS ENDOCANABINOIDES.

Los endocannabinoides (eCBs) son mediadores lipídicos que están implicados en una variedad de procesos fisiológicos incluyendo apetito, sensación de dolor, estado de ánimo y la memoria, estos compuestos son capaces de activar a los receptores a cannabinoides y constituyen las dianas moleculares primarias responsables de los efectos psicoactivos del Δ^9 tetrahidrocannabinol (THC). Estos lípidos bioactivos pertenecen, principalmente, a dos clases de compuestos: N-aciletanolaminas y ésteres acílicos, siendo N-arachidonylethanolamina (AEA) y 2-araquidonoilglicerol (2-AG) sus principales representantes (Fezza et al; 2014). Las amidas de ácidos grasos poliinsaturados están formadas por etanolamina unida mediante enlace amida a un ácido graso de al menos 20 carbonos y cuatro dobles enlaces. En este grupo se encuentra el primer endocanabinoide descubierto, la AEA. El 2-AG es un éster entre el ácido araquidónico y el glicerol, fue aislado de intestino canino y parece ser el agonista canabinoide selectivo por excelencia (Sugiura y cols., 2002). En la Fig. 1 se representan las estructuras químicas de los principales endocannabinoides.

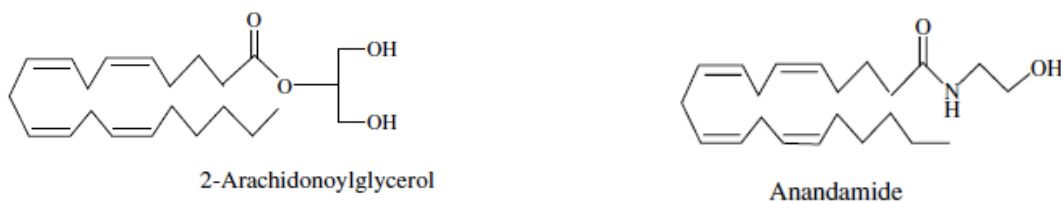


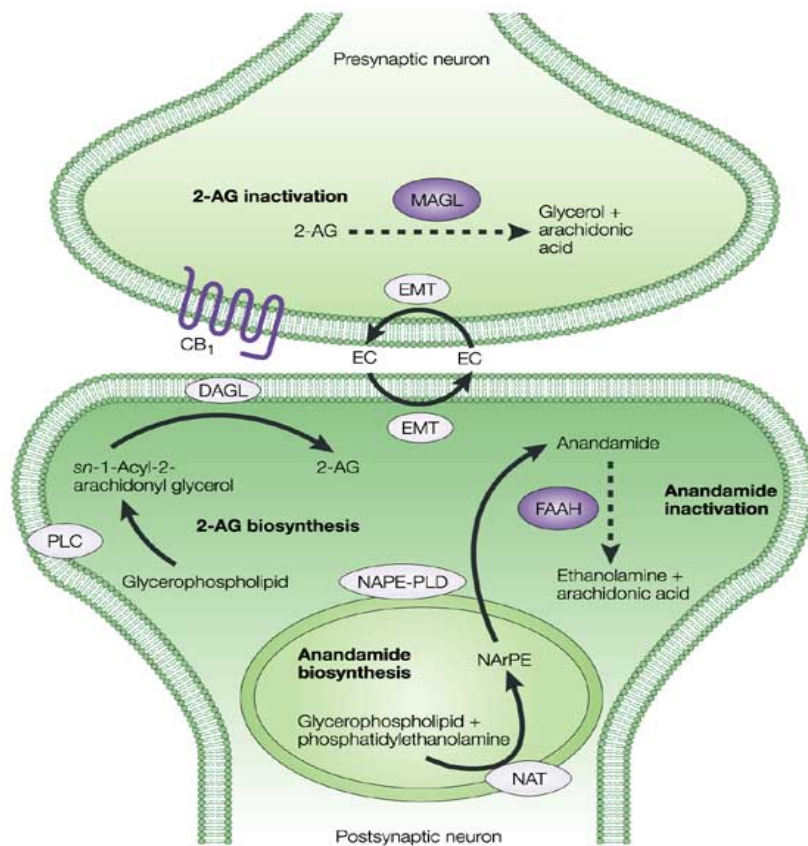
Figura 1. Estructura química de los principales endocannabinoides (Tomado de De Petrocellis; 2009).

2.1.1 SÍNTESIS Y METABOLISMO DE LOS ENDOCANABINOIDES

Los endocannabinoides se sintetizan y se liberan “bajo demanda” en respuesta a un incremento de Ca^{2+} intracelular generado por la despolarización, lo que sugiere que se producen en momentos de intensa actividad del Sistema Nervioso Central. El endocanabinoide 2-AG se sintetiza a partir de sn-1-acil-2-araquinodil-glicerol (AAG), producto de la hidrólisis del fosfatidil inositol mediado por la fosfolipasa $C\beta$. La enzima diacilglicerol lipasa sn1 específica (DAGL), dependiente de calcio, hidroliza AAG para sintetizar 2-AG. La ruta biosintética de la AEA y otras N-aciletanolaminas bioactivas se compone de dos reacciones enzimáticas: 1) la transferencia de un grupo acilo desde la posición sn-1 del glicerofosfolípido hacia el grupo amino de la fosfatidiletanolamina (PE) que resulta en la formación del N-acyl phosphatidylethanolamina (NAPE) y 2) la subsiguiente hidrólisis de NAPE para formar N-acylethanolamina y ácido fosfatídico. La primera reacción es catalizada por una enzima dependiente de Ca^{2+} N-aciltransferasa (NAT) y la última reacción por una fosfodiesterasa del tipo fosfolipasa D (NAPE-PLD) (Schmid et al; 1983). La estimulación de los receptores acoplados a proteínas G tales como los receptores metabotrópicos a glutamato del tipo 1 (mGluRs) para la síntesis de 2-AG (Jung et al; 2005) y los receptores dopaminérgicos del tipo D2 para AEA (Cetozze et al; 2004) juegan un papel muy importante en la síntesis de endocanabinoide por incremento de Ca^{2+} intracelular a nivel fisiológico.

En respuesta a esos estímulos, los eCBs son liberados al espacio extracelular como mensajeros retrógrados por las neuronas postsinápticas (probablemente por difusión pasiva o por proteínas acarreadoras requeridas para extruir endocannabinoides) y viajan a través de la hendidura sináptica para activar a los receptores CB1 localizados preferentemente en la membrana plasmática de la neurona presináptica (Di Marzo et al; 2011).

Las enzimas catabólicas para la AEA y 2-AG son diferentes. Ambos compuestos lipofílicos son metabolizados en el interior celular. La hidrolasa de ácidos grasos-1 (FAAH-1), expresada en la membrana del retículo endoplásmico de todos los mamíferos, degrada específicamente a la AEA en etanolamina y ácido araquidónico mientras que 2-AG es hidrolizado a través de la acción de la lipasa monoacilglicerol (MAGL) en ácido araquidónico y glicerol en las terminales presinápticas (Di Marzo, y Petrocellis ; 2012).



Nature Reviews | Drug Discovery

Figura 2: Síntesis y metabolismo de los cannabinoides endógenos (Modificado de Di Marzo, et al; 2004).

2.1.2 RECEPTORES A CANABINOIDES

En los tejidos de mamíferos se expresan al menos dos tipos de receptores acoplados a proteínas G que están firmemente establecidos como blancos de los endocannabinoides y son denominados receptores CB1 y CB2 por su abreviatura CB y el orden de descubrimiento (Howlett et al; 2002). Ambos receptores son miembros de la familia “A” de receptores acoplados a proteínas G de siete dominios transmembranales (GPCR), cercanos filogenéticamente a los receptores a prostaglandinas y lípidos (Brown; 2007), y tienen una identidad de secuencia de 44% (68% dentro de los dominios transmembranales). Los receptores CB1 y CB2 son receptores acoplados a proteínas $G_{\alpha i/o}$ sensibles a la toxina de Bordetella pertussis (PTX) y su activación conduce a la inhibición de la adenilato ciclasa (AC) (Howlett et al; 2002). Los receptores a cannabinoides contiene un dominio extracelular N-terminal que posee sitios de glicosilación, un dominio intracelular C-terminal acoplado a un complejo de proteína G y 7 segmentos transmembrana hidrófobos conectados por la alternancia de bucles extracelulares e intracelulares (Svíženskáa et al; 2008).

2.1.3 EXPRESIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE RECEPTORES CB1.

Los receptores CB1 parecen mediar la mayoría de los efectos psicoactivos del THC y compuestos relacionados. Este receptor acoplado a proteína G tiene una distribución amplia en el sistema nervioso: esta particularmente localizado en la corteza prefrontal, hipocampo, amígdala, el cerebelo y en ganglios basales; una distribución que corresponde a los más prominentes efectos conductuales de la cannabis. Los receptores CB1 se expresan principalmente en las neuronas, donde la mayoría de los receptores se

encuentran en los axones y terminales sinápticas modulando la neurotransmisión (Mackie; 2005).

2.1.4 SEÑALIZACIÓN

El receptor CB1 a cannabinoides está acoplado a proteínas $G_{\alpha i/o}$ a través de los cuales inhiben la actividad de la AC, estimulan las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), inhiben la actividad de los canales de calcio dependientes de voltaje de tipo N, P/Q y estimulan la actividad de los canales de potasio de rectificación entrante (GIRK) para transducir la unión del agonista en una respuesta biológica (Di Marzo et al; 2011). Debido a la disminución de las concentraciones de AMPc, la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) disminuye su actividad. En ausencia de los cannabinoides, la PKA fosforila a los residuos Serina/Treonina del canal de potasio, de ese modo, conduce a una disminución de la corriente de salida de potasio. En presencia de los cannabinoides, sin embargo, la fosforilación del canal por PKA se reduce, lo que conduce a una corriente de salida de potasio provocando la hiperpolarización en el microdominio (Svíženskáa et al; 2008). La inhibición de los canales de calcio presinápticos por los cannabinoides reduce la liberación de neurotransmisores desde las terminales presinápticas donde se expresan los receptores CB1 (Howlett et al., 2002). Basándose en estos hallazgos, se piensa que el principal papel de los cannabinoides es la inhibición de la liberación de neurotransmisores.

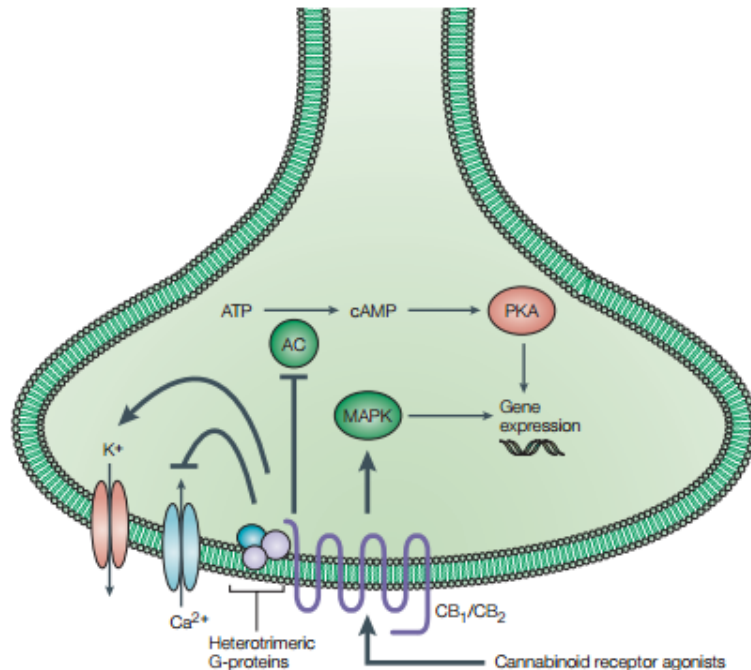


Figura 3: Las principales vías de señalización asociadas con la activación del receptor a canabinoide por agonistas. La activación de los receptores CB₁ y CB₂ a cannabinoides y la subsiguiente estimulación de las proteínas G α i / o heterotriméricas, es bien conocido por inhibir a la AC con su correspondiente inactivación de la PKA vía desfosforilación, o para la estimulación de MAPK. Estos eventos intracelulares conducen, entre otros efectos a la regulación de la expresión de varios genes. La estimulación del receptor CB₁ y la consecuente activación de las proteínas G α i / o es también acoplada directamente a la inhibición de los canales de Ca²⁺ activados por voltaje y la estimulación de los canales GIRK en las neuronas, con la subsecuente inhibición de la liberación de neurotransmisores (Tomado de Di Marzo et al; 2004).

2.1.5 ACCIÓN SINÁPTICA DE LOS CANABINOIDES

¿Cómo es la función de los cannabinoides en la sinapsis? Algunas respuestas habían surgido en la década de los 90 a partir del estudio de un fenómeno sináptico descrito por vez primera por Llano y Pitler. Estos estudios se centraron en las células de Purkinje del cerebelo (Llano y Marty; 1991), y los de Pitler en células piramidales del hipocampo (Pitler y Alger: 1992), donde mostraron que la despolarización breve de una neurona puede suprimir transitoriamente los eventos sinápticos GABAérgicos inhibitorios que le llegan. Ellos llamaron a este fenómeno "Supresión de la inhibición por

despolarización" o DSI en sus siglas en inglés. Los resultados fueron interesantes porque mostraron que el DSI tiene un locus presináptico, aunque es postsináptico en origen. En otras palabras, la despolarización postsináptica libera un mensajero retrógrado que viaja hacia atrás a través de las sinapsis para suprimir la liberación del neurotransmisor. El DSI es posiblemente el ejemplo más convincente de la rápida señalización retrógrada en el cerebro.

Otros estudios en el cerebelo también han mostrado que, el mensajero retrógrado en DSI afecta a las sinapsis glutamatérgicas en un fenómeno análogo denominan DSE (Despolarización induce supresión de la excitación) (Kreitzer y Regehr; 2001). Más adelante Wilson y Nicoll en el 2001 mostraron que el DSI es mediado por los receptores CB1 a cannabinoides presinápticos en hipocampo (Wilson y Nicoll; 2001) y en ese mismo año Kreitzer y Regehr lo demostraron en cerebelo (Kreitzer y Regehr; 2001). Por otro lado, estudios electrofisiológicos realizados por Yanovsky y colaboradores mostraron que en los ganglios basales, particularmente en la sustancia negra compacta y reticulada, el DSI es mediado por el receptor CB1 (Yanovsky et al., 2003), mientras que en el globo pálido externo fue mostrado por vez primera por Engler y colaboradores (Engler et al; 2006), siendo este el único reporte de este fenómeno en este núcleo.

2.1.5.1 MECANISMO POSTSINÁPTICO DEL DSI Y DSE

La despolarización postsináptica abrirá los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje permitiendo el influjo de calcio necesario para el DSI y DSE. La inducción de DSI y DSE requiere del Ca^{2+} postsináptico ya que el empleo de quelantes de dicho catión bloquea los mecanismos antes mencionados (Kreitzer y Regehr; 2001). La síntesis y la liberación postsináptica de endocannabinoides por esta vía debe ser bastante rápida. En la sinápsis del

hipocampo, la latencia entre la despolarización postsináptica y la inhibición presináptica es, en promedio, unos 1.2 segundos (Wilson y Nicoll; 2001).

La síntesis de endocanabinoide también puede ser provocada por la activación del grupo I de receptores de glutamato metabotrópicos (mGluRs). Se sabía con anterioridad que la activación del grupo I mGluRs puede suprimir la liberación de neurotransmisores, actuando en un locus presináptico, a pesar de que mGluRs del grupo I se localizan casi exclusivamente a las estructuras postsinápticas (Lujan et al; 1997).

2.1.5.2 MECANISMOS PRESINÁPTICOS DE LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR CB1

Debido a que el DSI hipocampal está completamente ausente en ratones *knockout* del receptor CB1, es probable que estos receptores sean el blanco presináptico para DSI en esa región (Wilson y Nicoll; 2001). Debido a que el receptor CB1 está presente en ambas sinapsis (excitatorias e inhibitorias) en las células de Purkinje, es un blanco plausible para DSE y DSI en el cerebelo (Lujan et al; 1997). La activación del receptor CB1 suprime la liberación local de neurotransmisores mediante la inhibición de un canal de Ca^{2+} dependientes de voltaje crítica para la liberación de vesículas sinápticas. Los canales de Ca^{2+} en sí, son inhibidos por el receptor CB1 (Hoffman y Lupica; 2000).

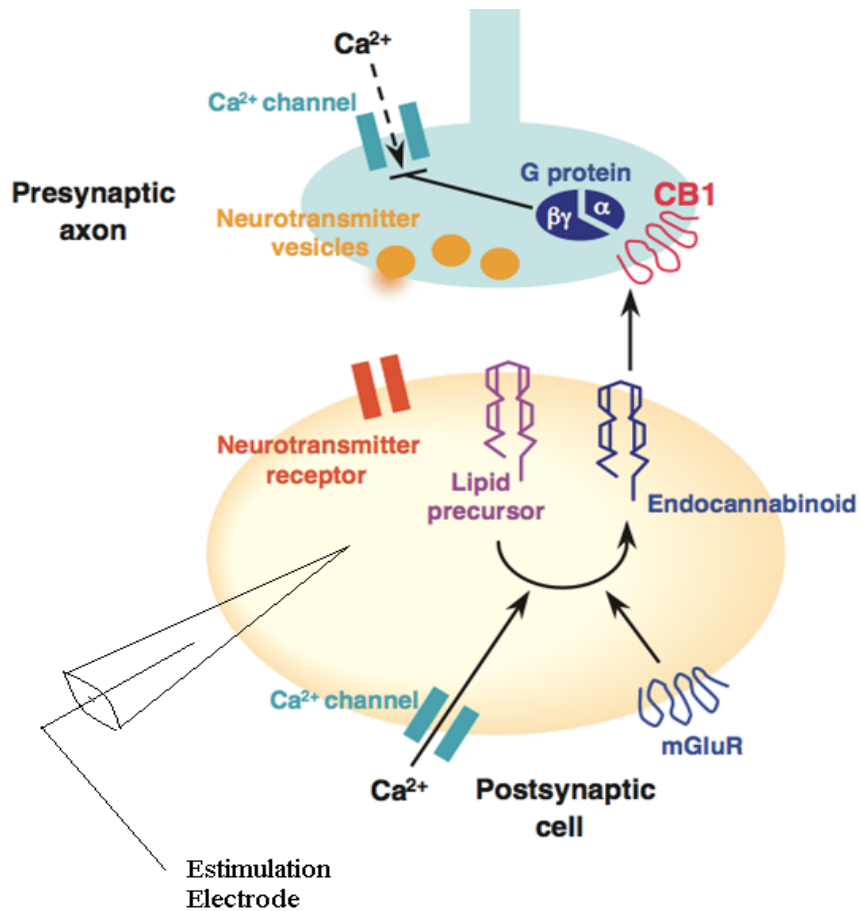


Figura 4: Acción sináptica de los endocannabinoides liberados por despolarización.

2.1.6 FUNCIÓN DE LOS RECEPTORES CB1 EN GANGLIOS BASALES

Como se mencionó, los receptores CB1 están distribuidos en varias regiones del sistema nervioso central localizándose específicamente en axones y terminales sinápticas de las neuronas. En los ganglios basales, su distribución es amplia en particular en el neocórtex, la sustancia negra pars reticulada, el núcleo entopeduncular y el segmento externo del globo pálido (Howlett, et al; 2002).

Existen evidencias anatómicas y funcionales que revelan el papel central de los receptores CB1 en ganglios basales, no obstante, antes de poner en evidencia estos hallazgos, es importante conocer cuál es su función y el rol que cumplen estos núcleos en el sistema nervioso.

2.2 GANGLIOS BASALES

El término ganglios basales (GB) se refiere a un grupo de núcleos de la base del cerebro interconectados entre sí e involucrados en una variedad de procesos que incluyen funciones motoras, cognitivas y emocionales. Los GB incluyen núcleos que se localizan en el telencéfalo, diencefalo y mesencéfalo dentro de los cuales encontramos al cuerpo estriado (STr), el globo pálido externo (GPe) e interno (GPi), el núcleo subtalámico (nST), la sustancia negra pars compacta (SNc) y pars reticulada (SNr). El sistema dopaminérgico inerva todas las estructuras de los GB, así como los centros motores del cerebro medio y el tálamo (Obeso et al; 2008).

Los GB, se encuentran formando lo que hoy en día se conoce como circuito de los GB; el estriado es el núcleo de entrada que recibe proyecciones glutamatérgicas de diferentes regiones corticales. En contraste, GPi y la SNr representan los principales núcleos de salida de los GB. Estas estructuras ejercen una influencia tónica GABAérgicas en las neuronas excitadoras premotoras del tálamo ventral. Entre las estructuras de entrada y salida, dos importantes sistemas de proyección, la llamada “vía directa” e “indirecta”, han sido identificados y son derivados de poblaciones neuronales separadas en el cuerpo estriado. La vía directa se origina a partir de las neuronas espinosas medianas de proyección que contienen GABA además de la sustancia P y Dinorfina las cuales proyectan monosinápticamente al GPi y SNr. La vía indirecta surge de las neuronas estriatales que contienen GABA y encefalina las cuales proyectan al GPi y a la SNr polisinápticamente a través de una secuencia de conexiones que implican el GPe y nST. Esta

secuencia comprende: (1) Una proyección inhibitoria GABAérgica desde el cuerpo estriado al GPe; (2) otra proyección GABAérgica inhibitoria del GPe al nST y (3) una proyección glutamatérgica excitatoria del nST al GPi y SNr. (Parent et al; 2001). A nivel del estriado, la dopamina facilita la transmisión GABAérgica a lo largo de la vía directa e inhibe la transmisión a lo largo de la vía indirecta, estos dos efectos opuestos están mediados por diferentes subtipos de receptores a dopamina de la familia D1 y D2 respectivamente.

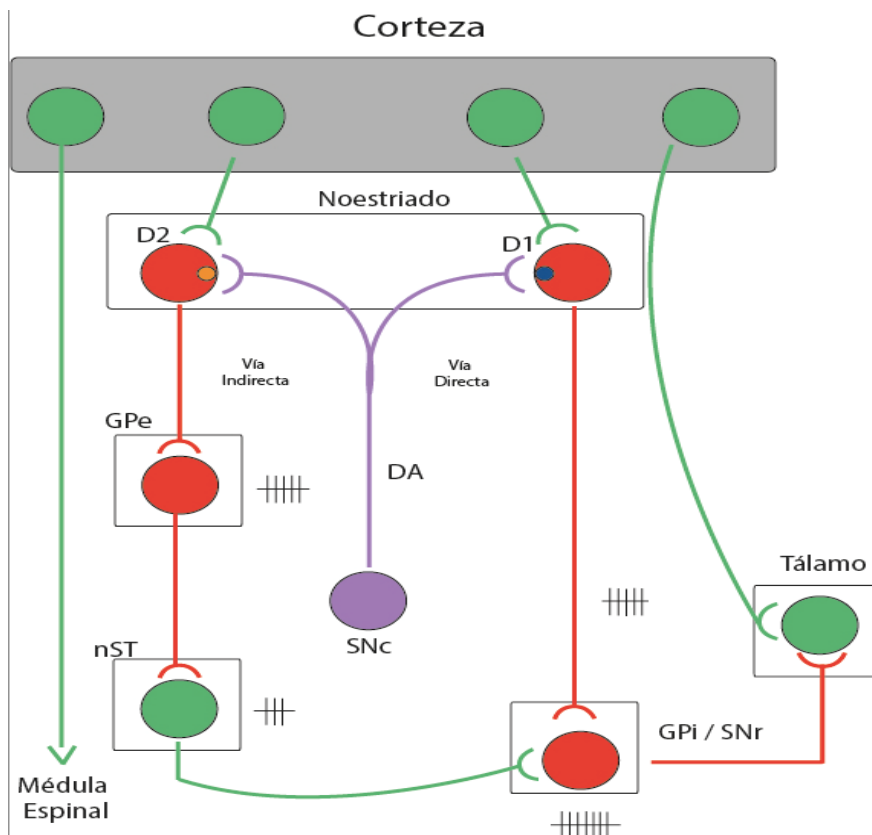


Figura 5. Representación esquemática del circuito de los ganglios basales. En color verde se representa las neuronas Glutamatérgicas que provienen de varias regiones corticales, del tálamo y el núcleo subtalámico. En rojo se representan las neuronas GABAérgicas de los Ganglios Basales y en morado las neuronas dopaminérgicas de la Sustancia Nigra Pars compacta. El círculo anaranjado representa el receptor D2 y el azul los receptores D1 (Modificado de Parent et al; 2001).

La activación tanto de la vía directa como de la indirecta conduce a cambios opuestos en el circuito de los GB. La activación de las neuronas GABAérgicas estriatales que dan lugar a la vía directa causan la inhibición de las neuronas GABAérgicas de los núcleos de salida, conduciendo a una desinhibición de los núcleos premotores del tálamo; en tanto que la activación de las neuronas estriatales que proyectan hacia el GPe (en la vía indirecta) conduce a una inhibición de los núcleos premotores del tálamo inhibiendo el movimiento (Blandini *et al*; 2000).

El correcto funcionamiento de la vía estriado-palidal perteneciente a la vía indirecta es determinante para modular el movimiento voluntario subconsciente ya que alteraciones en la vía, como es la ausencia de dopamina en la enfermedad de Parkinson (EP), conduce a una disminución en la actividad intrínseca de las neuronas palidales y subsecuentemente la excitación de los núcleos de salida provocando alteraciones en la actividad motora como es el temblor de las extremidades en reposo y bradiscinesia. Es por ello que estudiar los mecanismos por el cual se modula la transmisión GABAérgica en neuronas estriado-palidales es importante para la fisiología del control motor y como estrategia terapéutica para la EP.

2.2.1 EL GLOBO PÁLIDO EXTERNO

El GPe está situado en el centro del circuito de los ganglios basales y es considerado un componente de supresión motora en la vía indirecta. Las neuronas del GPe, en virtud de sus axones colaterales complejos y extendidos, están en condiciones de influir en la actividad y el flujo de información en todos los niveles de los GB. Todas las neuronas GPe proyectan al nST y a los núcleos de salida de los ganglios basales (SNr y el núcleo entopeduncular de roedores o GPi en primates), algunos también inervan la SNc, y alrededor de una tercio de ellos también proyectan hacia

atrás con el neostriado. Además, las neuronas GPe también dan lugar a axones colaterales locales (Kita y Kitai; 1994).

Las neuronas palidales son GABAérgicas (Smith y Bolam; 1989) y reciben inervación dopaminérgica a través de colaterales provenientes de la vía nigro-estriatal y de proyecciones que conforman una vía extra-estriatal, es decir, que inervan el resto de los ganglios basales además del estriado (Prensa y Parent; 2006). La entrada estriatal GABAérgica de las neuronas espinosas medianas de proyección (que preferentemente expresan el receptor D2) inhibe la frecuencia de disparo espontáneo de las neuronas palidales (Querejeta et al; 2001). Por otro lado la estimulación eléctrica en el nST incrementa el disparo espontáneo de las neuronas palidales (Perkins y Stone; 1980). Estas entradas inhibitorias y excitatorias mediadas por GABA y glutamato, regulan la actividad tónica GABAérgica de las neuronas palidales cuya función es determinante para la modulación del movimiento voluntario.

Las terminales estriado-palidales de la vía indirecta tienen receptores de tipo D2 que modulan la entrada proveniente de la corteza dando como resultado una inhibición de la liberación de GABA. Además de este tipo de receptores las neuronas espinosas medianas estriado-palidales también expresan otros tipos de receptores incluyendo los receptores a cannabinoides CB1 a nivel de las terminales sinápticas, los cuales se sabe que al ser activados modulan negativamente la liberación de GABA. No obstante cuando se coactivan con receptores D2 se facilita la liberación del neurotransmisor (González et al, 2009).

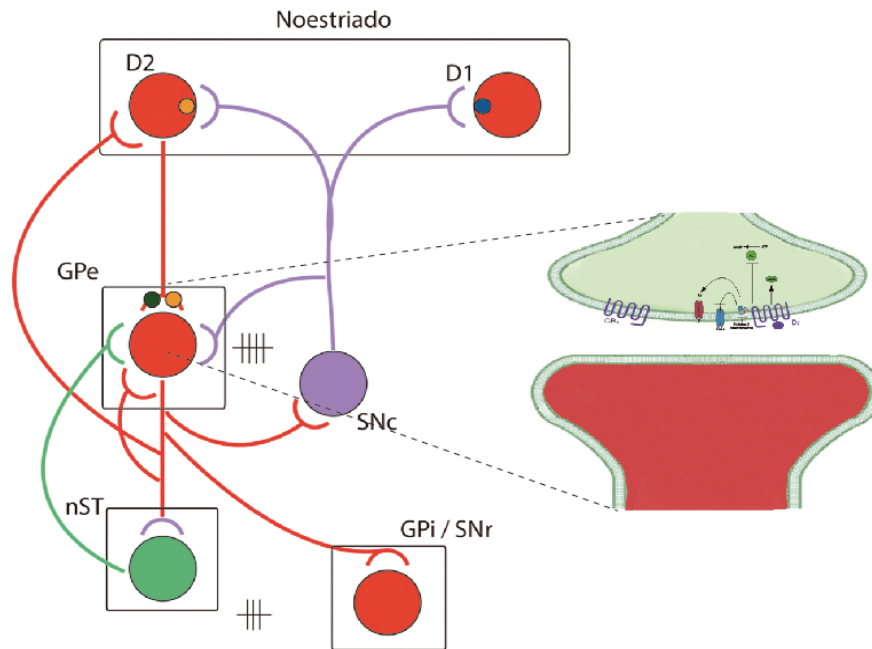


Figura 6: Representación esquemática del Globo pálido y sus conexiones sinápticas. En color verde se representa las neuronas Glutamatérgicas que provienen del núcleo subtalámico. En rojo se representan las neuronas GABAérgicas de los Ganglios Basales y en morado las neuronas dopaminérgicas de la Sustancia Nigra Pars compacta. La imagen de la derecha representa la terminal de las neuronas espinosas medianas del Noestriado en contacto con la neurona Palidial en rojo (Modificado de Parent et al; 2001).

2.2.2 LA DOPAMINA EN LA VÍA INDIRECTA

La proyección dopaminérgica proveniente de la SNC, inerva no solo al estriado, sino también a los núcleos restantes que constituyen los GB (Prensa y Parent; 2001). Las diversas acciones fisiológicas de la dopamina están mediadas por al menos cinco distintos subtipos de receptores. Todos los receptores a dopamina pertenecen a la familia de GPCRs con un alto grado de similitud entre su secuencia de aminoácidos primaria, tienen una estructura en común de siete dominios transmembranales y son capaces de activar las proteínas G heterotriméricas para inducir mecanismos de señalización intracelular (Beaulieu et al; 2011). Los cinco subtipos de receptores a dopamina en mamíferos son agrupados en dos familias: la

familia D1, compuesta por los subtipos D1 y D5, y la familia D2, integrada por los subtipos D2, D3 y D4; su clasificación principalmente es atribuida a la actividad que tienen sobre la enzima AC, por ejemplo: la familia D1, está acoplada a proteínas $G_{\alpha s/olf}$ que estimulan a esta proteína efectora, provocando así la producción de AMPc y una mayor actividad de PKA, por otro lado, la familia D2 inhibe la producción de AMPc disminuyendo la actividad de PKA debido a que estos receptores están acoplados a proteínas $G_{\alpha i/o}$.

En las terminales estriado-palidales se expresan preferentemente los receptores D2 que regulan la liberación de GABA modulando la actividad de las neuronas palidales de la vía indirecta, es por ello que se mencionarán preferentemente las características principales y funcionales de los receptores D2 en la vía, así como su expresión y distribución que nos permitirá entender a detalle la participación de este receptor y su influencia en la actividad motora.

2.2.3 EXPRESIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LOS RECEPTORES D2.

Los receptores dopaminérgicos se encuentran ampliamente distribuidos en diversas áreas del SNC donde son responsables de las diversas acciones fisiológicas de la dopamina. El receptor D2 se ha encontrado principalmente en el cuerpo estriado, en el tubérculo olfatorio, en el núcleo accumbens, donde es expresada por las neuronas GABAérgicas que co-expresan encefalinas (Akaoka; 1992). El análisis inmunohistoquímico con anticuerpos específicos reveló que los receptores D2 están presentes en las neuronas espinosas medianas del estriado estando más concentrados en las espinas dendríticas que en el soma. Además, las terminales de esas neuronas también son inmunoreactivas a receptores D2, formando sinapsis simétricas.

2.2.3.1 SEÑALIZACIÓN

Existen evidencias de que los receptores D2 se encuentran acoplados a proteínas G del tipo $G_{\alpha i/o}$ sensibles a la inactivación por PTX. Típicamente la activación del receptor conduce a la inhibición de la AC y por tanto disminuye la síntesis de AMPc. Los receptores D2 pueden también modular corrientes iónicas, en particular las activadas por voltaje, inhibiendo canales de Ca^{2+} o facilitando la apertura de canales GIRK (Jaber, M; 1996). Se ha reportado también que en líneas celulares transfectadas con el receptor D2 la estimulación del mismo provoca la formación de IP3 y la movilización de calcio a partir de depósitos intracelulares (Jackson, D; 1994).

3. ANTECEDENTES INMEDIATOS

El ARNm del receptor CB1 está presente en las neuronas espinosas medianas estriato-nigrales que expresan la sustancia P y los receptores D1 a dopamina, así como en las neuronas estriato-palidales que expresan encefalina y receptores D2. La despolarización de las neuronas del globo pálido, induce una breve supresión de las corrientes postsinápticas inhibitorias (IPSCs) evocadas, un efecto que se previene cuando se utiliza un antagonista selectivo de los receptores CB1, lo cual indica que los endocannabinoides liberados de las neuronas postsinápticas actúan sobre los receptores CB1 de las terminales del estriado para suprimir la transmisión GABAérgica (Engler et al; 2006).

Además, estudios recientes han demostrado por inmunohistoquímica la presencia del receptor CB1 en las recurrentes colaterales de las neuronas GPe (Chávez et al; 2013), mientras que el receptor D4, presente en esas neuronas, modula la liberación de GABA (Erlj et al; 2012). Este patrón de distribución sugiere que el sistema canabinoide y las vías ascendentes dopaminérgicas pueden interactuar el uno con el otro a dos niveles con los receptores D2 y eventualmente con receptores D4. De hecho, se ha reportado vínculos funcionales entre el sistema dopaminérgico y canabinoide específicamente entre el receptor D2 (D2R) y el receptor CB1 (Cetozze; 2004) particularmente en el GPe y el estriado. Además, por medio de ensayos de hibridación *in situ* e inmunocitoquímica emparejados con microscopía electrónica se ha demostrado la colocalización de CB1 con D2R en terminales estriado-palidales (Hermann et al; 2002).

En cultivo de neuronas estriatales, Glass y Felder encontraron que la coactivación de CB1 y D2, usando agonistas selectivos, conduce a un aumento en la formación de AMPc, un efecto que no se observa con la activación individual de esos receptores, es decir, la activación de D2 o CB1

inhibe la acumulación del segundo mensajero (Glass y Felder; 1997). Ellos además sugieren que ese efecto puede ser mediado por un cambio en la proteína G de acoplamiento, de $G\alpha_i$ a $G\alpha_s$, una observación que se ve reforzada por el tratamiento con PTX, ya que la estimulación de la acumulación de AMPc también se observa en el tratamiento con la toxina y tiene una EC_{50} similar a la observada con la estimulación concurrente de CB1 y D2. Del mismo modo, la activación de los receptores D2 parece mediar el cambio de acoplamiento del receptor CB1 para $G\alpha_s$ (Jarrahian et al. 2004) probablemente por una disminución en la disponibilidad de proteínas $G\alpha_{i/o}$ (González et al, 2009). Estudios adicionales muestran el vínculo funcional de $G\alpha_s$ con CB1 en células de ovario de hámster chino (CHO) (Felder et al., 1998). Es probable que dicho cambio de acople se presente en el aumento en la liberación de GABA inducido por la co-activación de receptores CB1 y D2 en el globo pálido (González et al, 2009).

Juntos, los estudios descritos anteriormente indican que los receptores CB1 pueden acoplar a múltiples proteínas G ($G\alpha_s$ y $G\alpha_{i/o}$) después de su activación bajo ciertas condiciones, previniendo la inhibición o facilitando la liberación de GABA. Otra explicación a los efectos funcionales de la coactivación de receptores CB1-D2 es la formación de heterómeros, Kearns y colaboradores en el 2005 demostraron que el tratamiento con CP55.940 un agonista CB1 y quinpirol agonista D2 conduce a un aumento en los niveles del complejo dimérico CB1-D2R (Kearns et al. 2005). No obstante no hay evidencia suficiente que nos permita corroborar la formación de heterómeros CB1 y D2 en sistemas nativos y el efecto ocasionado tras su activación.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el laboratorio es de nuestro particular interés centrarnos en un componente de los GB involucrado en la regulación del movimiento involuntario y conocido, también, como centro integrador de la neurotransmisión: el globo pálido. La regulación de la liberación de GABA en terminales estriado-palidales y en recurrentes colaterales de las neuronas del GPe es determinante para el control del movimiento, ya que al modificar la liberación del neurotransmisor se modula la actividad motora.

La dopamina es el principal neuromodulador del circuito de los GB y es la encargada de regular negativamente la liberación de GABA por medio de receptores de la familia D2 presinápticos preferentemente expresados en terminales nerviosas que conforman la vía indirecta. Además, otros estudios han encontrado que el sistema canabinoide participa como agente neuromodulador en terminales estriado-palidales similar a la acción dopaminérgica. A través de receptores CB1 abundantemente expresados en esas terminales, los canabinoides inhiben la liberación de GABA. No obstante, diferentes líneas de investigación han mostrado que los receptores a dopamina D2 de estas terminales interactúan con receptores CB1 presinápticos en el control de la liberación de GABA, los cuales al ser coactivados producen un aumento en la liberación del neurotransmisor. Estos efectos han sido explicados por el cambio de acople a proteínas G del receptor CB1 o bien a procesos de dimerización inducida por coactivación, sin mayor evidencia experimental al respecto. Las hipótesis sugeridas para explicar este fenómeno se basan en estudios de sistemas de expresión heteróloga y en estudios *in vitro* mediante el empleo de agonistas farmacológicos selectivos de los receptores sin haber sido mostrados que el fenómeno también ocurre por los endocannabinoides, lo cual es importante de dilucidar ya que no se cuenta con suficiente evidencia experimental. Además los experimentos realizados por Engler y colaboradores demostraron por vez primera evidencias de la síntesis y liberación de endocannabinoides por DSI

en neuronas GPe, sin embargo, la concentración de EGTA usada en la pipeta fue muy elevada (10 mM) y el tiempo de despolarización muy corto (5s), lo cual indica que, probablemente el tiempo de despolarización y la concentración de calcio no fueron adecuados para sintetizar suficiente endocanabinoide, ya que la respuesta en las IPSCs evocadas no fue muy clara. Por otro lado, en los experimentos de González y colaboradores, se sabe que el GABA radioactivo liberado por solución con alto K^+ proviene de las recurrentes colaterales del GPe y de las aferentes del estriado; sin embargo, podría ser que el receptor CB1 también se exprese en las recurrentes colaterales junto al receptor dopaminérgico D4, que es de la misma familia del receptor D2 y por tanto, no se sabe si el fenómeno observado en el aumento en la liberación de GABA cuando se coactivan el receptor CB1 y D2 también podría estar presente en terminales colaterales del GPe. Además las concentraciones de agonistas usadas en ese trabajo fue muy elevado lo que podría cambiar radicalmente el efecto.

Muchas veces las respuestas farmacológicas observadas son distintas a las fisiológicas originadas por los neurotransmisores endógenos, es por eso que se pretende estudiar el efecto de los endocannabinoides a través de la activación del receptor CB1 sobre la liberación de GABA de las colaterales del GPe y si la co-activación con receptores D4 conducirá a un aumento en la liberación de dicho neurotransmisor, que depende del aumento en las concentraciones de AMPc. De esa manera podremos entender otros factores que regulan la liberación de GABA en el GPe cuya importancia para la fisiología del control motor y la enfermedad de Parkinson son relevantes, así como contribuir al entendimiento de las acciones de los endocannabinoides en los procesos de control de la liberación de neurotransmisor y conocer otros mecanismos importantes sobre los receptores a cannabinoides ya que podrían estimular la liberación de GABA, lo que cambia el concepto clásico, además de proporcionar evidencia sólida basada en electrofisiología.

5. HIPÓTESIS

La activación de receptores de la familia D2 de las colaterales del GPe modifica el efecto inhibitorio de los receptores CB1 activados por cannabinoides endógenos, sobre la liberación de GABA por un incremento en los niveles de AMPc y activación de la PKA.

6. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de la coactivación de la familia de receptores D2 y CB1 sobre la transmisión GABAérgica pálido palidal estimulando los receptores CB1 por los endocannabinoides.

7. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Producir DSI en neuronas de Globo Pálido externo de rebanadas de cerebro de ratón utilizando diferentes concentraciones de EGTA y tiempos de despolarización.
2. Determinar si el efecto del DSI es mediado por endocannabinoides y receptores CB1 a través del uso de antagonistas selectivos.
3. Determinar si la activación de receptores de la familia D2 con agonistas selectivos previene el efecto del DSI y si esta respuesta depende de receptores a cannabinoides.
4. Determinar si la respuesta facilitadora de la IPSCs por la coactivación de receptores de la familia D2 y CB1 dependen de incrementos en la actividad de PKA.
5. Ver qué receptores están involucrados en el efecto del agonista no selectivo (Quinpirol) utilizando un antagonista específico de receptores D4.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 Obtención de rebanadas.

Nuestro modelo biológico para este proyecto fueron ratones de la cepa C57 de 12 a 14 días de edad. Los ratones se colocaron dentro de un frasco en presencia de cloroformo para ser anestesiados por inhalación. Una vez anestesiados los ratones, se procede a la decapitación para obtener el cerebro lo más rápido posible y éste se coloca sobre una placa metálica con hielo. Posteriormente, con una navaja se cortó el cerebelo, los bulbos olfatorios y se separaron los hemisferios para después ser colocados, con ayuda de cemento acrílico, sobre una caja Petri posicionada en un soporte móvil del vibrátomo. Más adelante, se retira el exceso de pegamento y se adiciona la solución de disección (Tabla 1) fría hasta cubrir el tejido cerebral. Finalmente, con ayuda del vibrátomo, se obtienen rebanadas sagitales de 250 μm de grosor. En el siguiente paso, las rebanadas fueron depositadas en un vaso de precipitado que contiene la solución externa (Tabla 1) para estabilizar el tejido durante una hora a temperatura ambiente y con burbujeo constante de gas carbógeno (95 % O_2 y 5% CO_2). La solución de disección tiene una composición semejante al fluido cerebro espinal.

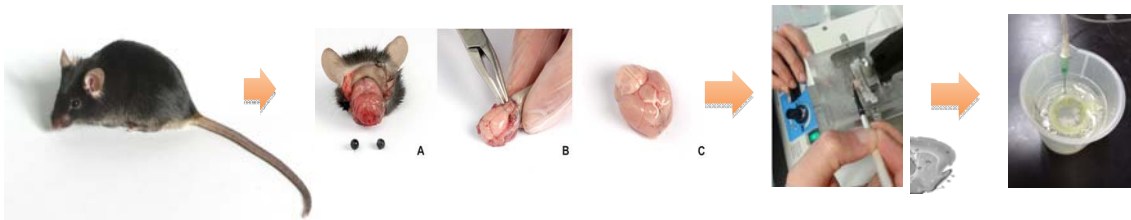


Figura 7. Modelo biológico y obtención de rebanadas. Un ratón de la cepa C57 de 12 a 14 días de edad, sexo indistinto, se decapita y se obtiene el cerebro para obtener rebanadas de 250 micras de grosor con ayuda de un vibrátomo. Posteriormente las rebanadas se dejan estabilizar durante una hora en solución externa con burbujeo constante de gas carbógeno (95 % O_2 y 5% CO_2).

Una vez que se cumple el tiempo de incubación, se elige una rebanada que contenga el núcleo de interés, en este caso el GPe y se transfiere a una cámara de registro fijándola con un bastidor que contiene fibras de nylon para evitar el movimiento de la rebanada. La cámara de registro se coloca en la platina de un microscopio perfundiéndola constantemente con la solución de disección a una velocidad de 1-2 ml por minuto en presencia de la mezcla gaseosa. Las neuronas del GPe fueron visualizadas con un microscopio de luz infrarroja de contraste diferencial (IR-DIC) a través de un objetivo de inmersión en agua de 40 X.

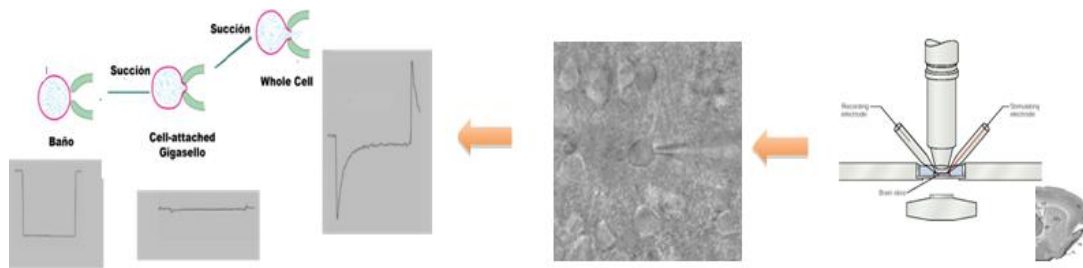


Figura 8. Identificación de neuronas del GPe. Una vez que se cumple el tiempo de incubación, la rebanada se transfiere a una cámara de registro la cual se coloca en la platina de un microscopio y mediante un objetivo de inmersión 40X la imagen es proyectada a una videocámara. Finalmente, se elige una neurona para establecer la fijación de voltaje y así registrar las IPSCs.

8.2 Soluciones

Las soluciones que perfunden la rebanada fueron preparadas a partir de soluciones madre al momento de ser utilizadas y se ajustó a un pH de 7.4 mientras se burbujea con la mezcla gaseosa. Para la solución interna se utilizó HEPES como buffer y el pH se ajustó entre 7.25 y 7.3 con ayuda de KOH o CsOH, ya que la composición varió de acuerdo a cada condición experimental. Por último, la solución interna fue filtrada con ayuda de un filtro milipore de 0.22 micras y se utilizó HEPES como buffer.

Tabla 1. Solución Externa en mM	
NaCl	135
KCl	4
KH ₂ PO ₄	0.4
NaHCO ₃	2
MgCl ₂	5
CaCl ₂	10
Glucosa	0.5
pH: 7.45	

Tabla 2. Solución Interna en mM	
CICs	135
NaCl	4
GTP	0.4
Mg ATP	2
EGTA Cs	0.5 y 10
HEPES	10
CaCl ₂	0.5
pH: 7.25	

Tabla 3. Solución Interna Gluconato de K+ en mM	
Gluconato de K+	135
NaCl	4
GTP	0.4
Mg ATP	2
EGTA Cs	0.5
HEPES	10
CaCl ₂	0.5
pH: 7.25	

8.3 Registro Electrofisiológico

8.3.1 Pipetas

Las pipetas utilizadas se fabricaron con capilares de borosilicato WPI PG52165-4 las cuales fueron estiradas usando un estirador vertical DAVID KOPF 730. Para determinar la resistencia de la micro pipeta en el baño (solución externa), se ajustó en el holder del set y se aplicó un pulso cuadrado de 10 mV de amplitud con 8 ms de duración, se midió el valor de la respuesta en corriente y, de acuerdo a la ley de Ohm, se obtuvo el valor de la resistencia que fue de 3 a 5 MΩ.

8.3.2 Registro

Los registros se obtuvieron usando la técnica de *Patch clamp* en su configuración de célula completa, en la modalidad de fijación de voltaje para registrar las corrientes postsinápticas inhibitorias espontáneas con ayuda de bloqueadores de receptores inotrópicos a glutamato (ver tabla 3). La cámara de perfusión con la rebanada se colocó sobre la platina de un microscopio Axioscop I (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) que tiene adaptada una videocámara Hamamatsu C2400-50 (Hamamatsu Photonics System, USA), la cual proyecta la imagen a un monitor TOSHIBA. Se usó un amplificador Axopatch 200A (Axon Instrument), una tarjeta de adquisición analógico-digital DIGIDATA 1200 (Axon Instrument, Foster City, CA) operada a través del paquete Pclamp 7.0 (Axon Instrument) instalado en una computadora PC. Para el monitoreo del registro durante el experimento se empleó un osciloscopio digital incluido en el programa CLAMPEX 9.0.

La micropipeta fue colocada sobre la célula con ayuda de un micromanipulador pizoeléctrico. Se aplicó presión positiva en el interior de la micropipeta, lo cual permite limpiar la superficie de la neurona.

Posteriormente se retira la presión positiva y se aplica presión negativa; lo cual permite la formación del sello en el orden de $G\Omega$ ($>5 G\Omega$), entre la pipeta y la membrana de la neurona. Más adelante se aplicó una débil presión negativa para romper el segmento de la membrana contenido en la micropipeta, logrando así el registro en la configuración de célula completa.

8.3.3 Corrientes espontáneas inhibitorias

Para realizar el registro de corrientes espontáneas se adicionó $20 \mu\text{M}$ de CNQX y AP5 al baño de la preparación con el objetivo de bloquear los receptores ionotrópicos activados por glutamato de tipo AMPA y NMDA y como consecuencias registrar las corrientes inhibitorias espontáneas mediadas por GABA a través de la activación de receptores a GABA a.

Para la técnica de la despolarización por supresión de la inhibición (DSI), que consiste en inducir la salida de endocanabinoide, se empleó una solución interna modificada de CICs que contiene bajas cantidades del amortiguador de Ca^{2+} EGTA con la finalidad de no afectar la síntesis de endocanabinoides mediadas por Ca^{2+} y a su vez, con Cs, se bloqueó la corriente entrante y saliente mediada por los canales de K^+ . El tiempo de despolarización usada en este protocolo fue de 10 segundos para la mayoría de los experimentos realizados, ya que la respuesta registrada del endocanabinoide fue más clara. Para los registros del DSI, se midió la corriente postsináptica inhibitoria espontánea basal durante cinco minutos, posteriormente se inyectó corriente despolarizante en las neuronas palidales cambiando el potencial de reposo de -60 a 0 mV durante 10 segundos y se procedió a registrar nuevamente la corriente postsinaptica inhibitoria espontánea inmediatamente después del evento despolarizante. Estos registros permiten detectar el efecto mediado por los endocanabinoides sobre la liberación del neurotransmisor así como el curso temporal de su respuesta. La señal registrada fue filtrada a 2 KHz.

Para determinar si el DSI en el GPe es mediado por endocanabinoides y

receptores CB1, se administró AM 251, un antagonista del receptor CB1, a una concentración de 90 nM en la solución externa que perfundió la rebanada durante todo el tiempo del registro. Una vez perfundida la rebanada, se tuvo acceso a la neurona palidal y se realizó la técnica del DSI como se describió anteriormente para registrar las corrientes post-sinápticas inhibitorias espontáneas por diez minutos.

En experimentos que consisten en estudiar la respuesta del DSI en diferentes condiciones, se utilizaron dos soluciones internas con diferentes concentraciones del quelante de Ca^{2+} EGTA (0.5 y 1 mM) y con diferentes tiempos de despolarización (5 y 10 s), lo que modifica las concentraciones de Ca^{2+} intracelular y por ende la cantidad de endocanabinoide disponible. Una vez que se registró la IPSCs espontánea durante 5 min se procedió a realizar el DSI en la neurona palidal durante 5 s, inmediatamente después del evento despolarizante, después se procede a registrar una vez más la IPSCs espontánea durante 10 min. Posteriormente se volvió a despolarizar a la neurona durante 10 s registrando la corriente inhibitoria durante los próximos 10 m. En todo este procedimiento no hubo cambios en la solución externa que perfundió la rebanada y se repitió este procedimiento para cada una de las condiciones donde hay poco y mucho EGTA.

En experimentos diseñados para investigar si la activación de receptores D2 con agonistas selectivos previene el efecto del DSI, se administró quinpirol 10 μM al baño de la preparación después de haber registrado por 5 min la IPSCs espontánea. Una vez que se administró el agonista, se registró por 10 min la IPSCs con el objetivo de ver el efecto del fármaco. Posteriormente se procedió a realizar el DSI durante diez segundos para volver a registrar las corrientes inhibitorias después del evento despolarizante. Para corroborar que esta respuesta depende de receptores a canabinoides, se procedió a realizar el mismo protocolo experimental con la única diferencia que el antagonista de los receptores CB1 (AM251) estuvo presente desde el inicio del experimento.

Para ver si la respuesta facilitatoria en la liberación de GABA provocada por la co activación de receptores de la familia D2 y CB1 dependen de incrementos en la actividad de PKA, se empleó un tratamiento con H89, inhibidor de la enzima. Las rebanadas se incubaron en una solución externa que contiene 10 μ M de H89 en un periodo de 5 min previas al registro, posteriormente las rebanadas se transfirieron a la cámara de registro con la solución externa en presencia del fármaco en donde se procedió a registrar por 5 min la IPSCs espontánea. Más adelante se administró Quinpirol al baño de la preparación para registrar el efecto del mismo durante 10 min y, finalmente, se aplicó el protocolo del DSI para una vez más registrar por 10 min la actividad resultante.

Por último, para ver qué tipo de receptores D2 like están involucrados en el efecto del Quinpirol y DSI, se empleó un antagonista específico de los receptores D4 (L 745, 870). Desde el inicio del registro se administró 500 nM de L 745,870 al baño de la preparación que perfunde la rebanada. El siguiente paso fue registrar las IPSCs en esa condición durante 5 min, posteriormente se administró Quinpirol 10 μ M y se volvió a registrar la corriente durante 10 min para que finalmente se aplique el protocolo de DSI y registrar, una vez más la actividad resultante durante 10 min como se mencionó anteriormente. Únicamente se tomaron en cuenta las neuronas que terminaron el tratamiento y que no presentaron cambios notorios en la corriente de mantenimiento, así como aquellas neuronas que tuvieron actividad espontánea.

8.4 Análisis estadístico

Las corrientes postsinápticas inhibitorias espontáneas (IPSCs) se analizaron mediante el programa Minianalysis (Synaptosoft). El programa cuenta los eventos y una vez que se tiene el número de corrientes, los clasifica con base en su valor de amplitud o el intervalo inter-evento. Con los datos analizados se hicieron curvas temporales de porcentaje frecuencia usando el programa estadístico Graph pad prism que uso la prueba de comparación

múltiple de Bonferroni para el análisis estadístico y así, determinar el nivel de significancia entre la población de eventos control y bajo el efecto de los fármacos. La adquisición de los trazos representativos se realizó a través del programa CLAMPEX 9.0.

9. RESULTADOS

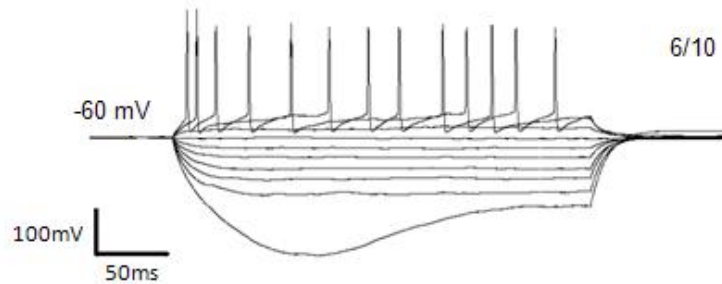
9.1 IDENTIFICACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DE LAS NEURONAS DEL GLOBO PÁLIDO EXTERNO

Las neuronas del GPe se han clasificado en tres tipos (tipo A, B y C) según las diferentes propiedades electrofisiológicas, que se ponen de manifiesto al aplicar pulsos de corriente hiperpolarizante y despolarizante y registrando la respuesta en voltaje. Las diferencias se reflejan además en la resistencia de entrada y en el patrón de disparo (Standford y Cooper; 2000). Una vez ubicado el globo pálido, con base a referencias anatómicas, la primera parte de este trabajo consistió en realizar registros intracelulares, en nuestro caso usando la técnica de *patch clamp* en su configuración de célula completa, con la cual se aplicaron protocolos de pulsos de corriente hiperpolarizante y despolarizante de 20 en 20 pA con duración de 300 ms, protocolos similares a los utilizados por Standford y Cooper para caracterizar a las neuronas palidales de la rata y para ver el patrón de disparo. Este protocolo fue usado con el objetivo de ver el tipo neuronal y las propiedades intrínsecas de la neurona y se determinaron usando una solución de gluconato de potasio.

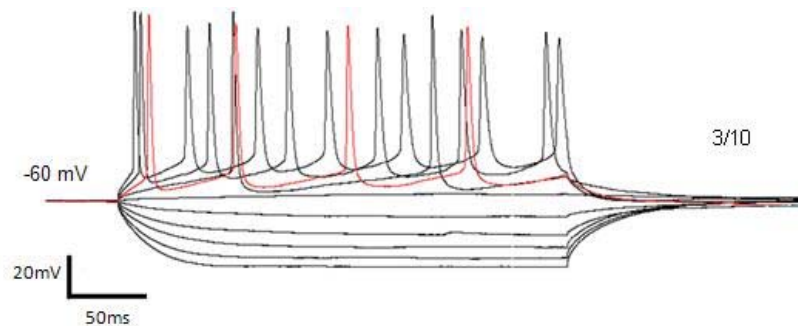
En 6 de 10 neuronas registradas presentaron una marcada deflexión en el voltaje ante pulsos hiperpolarizantes, probablemente asociada a la activación de una corriente catatónica inespecífica activada por hiperpolarización (I_h) sin presentar potenciales de acción al término de los pulsos. Ante pulsos despolarizantes, se observaron disparos regulares de potenciales de acción. Estas neuronas tienen las propiedades similares a las neuronas de tipo "A" caracterizadas por Standford y Cooper en el GPe de la rata (ver figura 9 A). Por otro lado, 3 de 10 neuronas no presentaron la

deflexión en el voltaje ante pulsos de corriente hiperpolarizante, o bien fue muy pequeña, tampoco presentaron potenciales de acción al término de los pulsos, sin embargo, el disparo fue irregular ante pulsos despolarizantes además de presentar una hiperpolarización post potencial lenta con una despolarización en forma de rampa entre los potenciales de acción, probablemente asociada a la participación de una corriente de potasio de tipo I_A . Estas neuronas tienen propiedades similares aunque no iguales a las de tipo B como la describen Stanford y Cooper y tienen actividad quiescente (Ver figura 9 B). Finalmente se encontró una neurona que, además de no presentar la deflexión en el voltaje ante pulsos hiperpolarizantes, presentó una gran latencia al disparo de potenciales de acción producidas por pulsos despolarizantes la cual se asocia a la participación de la corriente I_A . Esta neurona fue similar a las de tipo C. Con estos resultados corroboramos el registro de neuronas del GPe.

A



B



C

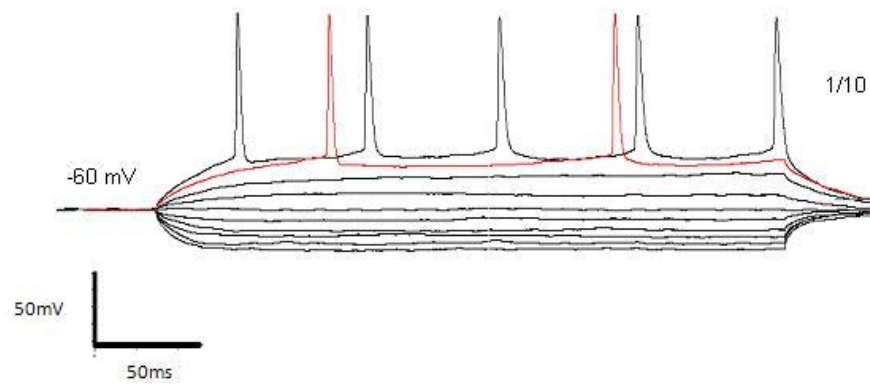


Figura 9. Identificación electrofisiológica de neuronas de GPe de ratón. En la primera figura se observan las propiedades electrofisiológicas de 6 neuronas registradas en modo de fijación de corriente. Se observa claramente una pronunciada deflexión en el voltaje ante pulsos de corriente hiperpolarizante. Al término del pulso de corriente las neuronas son quiescentes, es decir, no disparan potenciales de acción en reposo y ante pulsos despolarizantes las neuronas disparan potenciales de acción regulares. En la figura B se muestra el registro representativo de voltaje de 3 neuronas que presentan propiedades similares a las neuronas de tipo B caracterizadas por Stanford y Cooper, es decir, no hay deflexión en el voltaje ante pulsos hiperpolarizantes, presentan disparos irregulares ante inyección de corriente despolarizante y son quiescentes al término del pulso. En la figura C se muestra el trazo de una neurona palidal cuyas propiedades mostradas se asemejan a las de tipo C.

9.2 IDENTIFICACIÓN DE LAS CORRIENTES POSTSINÁPTICAS INHIBITORIAS ESPONTÁNEAS DEL GLOBO PÁLIDO EXTERNO

Antes de estudiar los efectos del DSI sobre las neuronas palidales, se procedió a identificar las IPSCs registrados en el GPe. Para los registros de las IPSCs espontáneas se hizo *patch clamp* en configuración de célula completa y se mantuvo a la célula a un potencial de membrana a -60 mV por fijación de voltaje mientras se perfunde constantemente la rebanada con solución externa (Tabla 1) en presencia de la mezcla gaseosa a temperatura ambiente. Para el registro de las corrientes se empleó la solución interna de CsCl⁻ con el objetivo de visualizar mejor las corrientes iónicas GABAérgicas debido a la ausencia de caída electrotonica. En la Figura 10A, se muestra el trazo de corriente representativa dependientes de GABA y Glutamato de un experimento, luego se les aplicó CNQX (50 μM) y AP5 (20 μM), al baño de la preparación donde se observa únicamente las corrientes insensibles a esos bloqueadores, es decir, las corrientes GABAérgicas. Más adelante se puede ver como las corrientes glutamatérgicas reaparecen después del lavado de los fármacos.

Posteriormente, a las corrientes insensibles a CNQX y AP5, se administró bicuculina (10 μM), un antagonista de los receptores a GABA_A donde se observa claramente como desaparecen las corrientes, lo cual indica que se trata de IPSCs espontáneas mediadas por la apertura de receptores a GABA_A (Figura 10B). Más adelante, se muestra el registro de IPSCs espontánea GABAérgica después de 10 min de lavado de la bicuculina. Por lo tanto, el efecto en el bloqueo de entrada de corriente mediada por el canal a GABA_A es lavable después de diez minutos y son dependientes de voltaje ya que al despolarizar a la neurona a +40 mV las IPSCs se invierten debido a que el voltaje aplicado es más positivo que el potencial de equilibrio del ion Cl⁻ (0 mV) (Ver figura 10C y D).

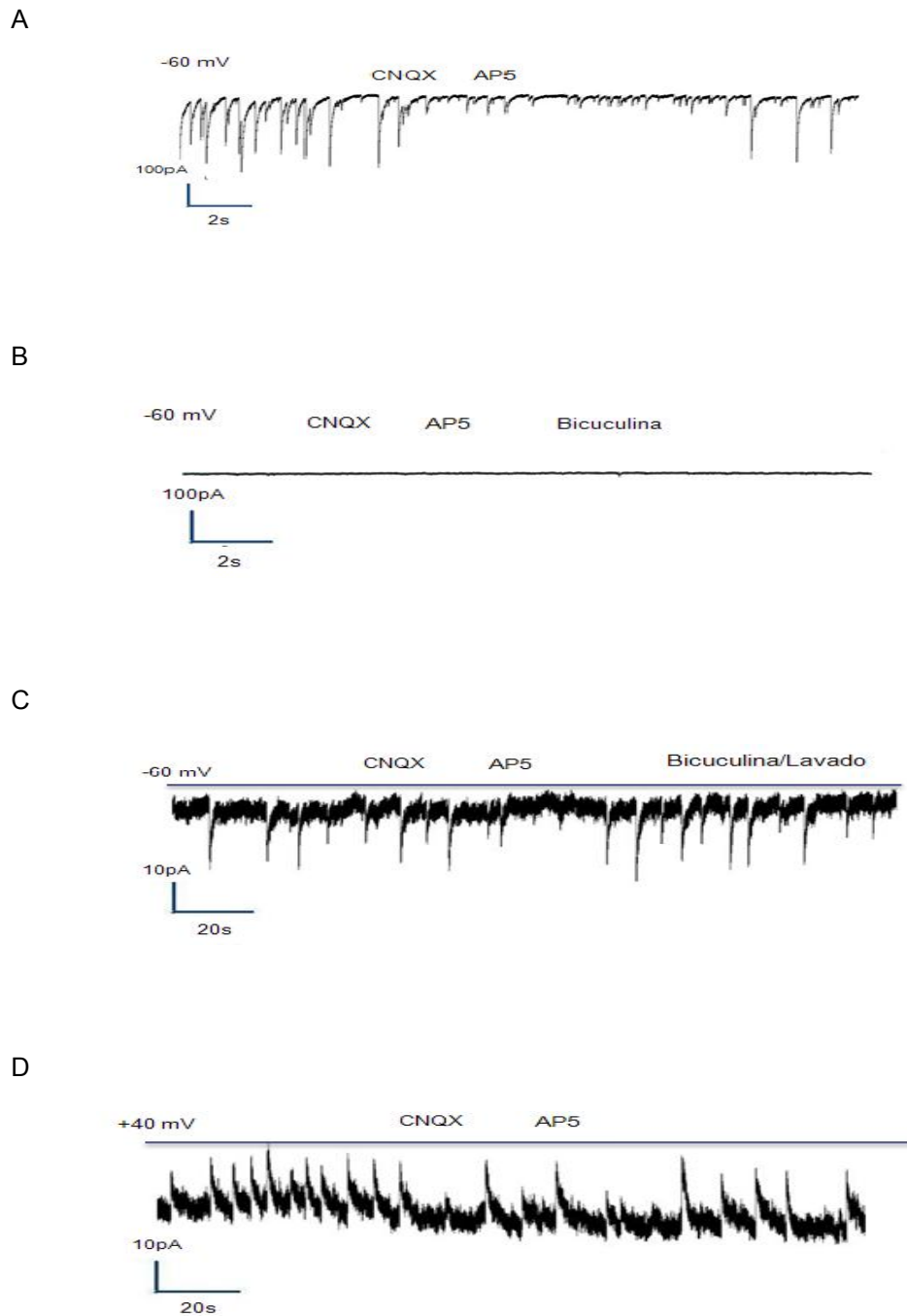


Figura 10. Registro de las IPSCs espontáneas en el GPe. En la figura A se representan las corrientes postsinápticas a un voltaje fijado a -60 mV y las IPSCs espontáneas insensibles a CNQX (50 μM) y AP5 (20 μM). En B se muestra el efecto de la bicuculina (10 μM) sobre las IPSCs espontáneas. En C las IPSCs vuelven a aparecer después de 10 min de lavado de la preparación y D) se muestra como las IPSCs se invierten cuando el potencial de membrana de la neurona está por arriba del potencial de equilibrio del ion Cl⁻

9.3 EFECTO DEL DSI BAJO CONDICIONES DE ALTO Y BAJO QUELANTE DE Ca^{2+}

Una vez que supimos que caracterizamos las neuronas del globo pálido y que podemos medir las IPSCs espontáneas se procedió a realizar la técnica del DSI. La respuesta de los endocannabinoides liberados por DSI sobre la IPSCs depende del tiempo de estimulación y la cantidad de Ca^{2+} disponible (Lenz R y Alger; 1999), es por ello que decidimos realizar experimentos en neuronas del GPe que muestre la respuesta del DSI bajo condiciones distintas usando dos soluciones internas de bajo y alto contenido de EGTA (0.5 mM y 10 mM) además de estimular a la neurona por 5 y 10 s. El protocolo consistió en medir las IPSCs espontáneas por un periodo de cinco minutos, posteriormente se despolariza la neurona por 5 s (-60 a 0 mV) registrando los IPSCs por 5 min después del primer evento despolarizante, más adelante se procedió a realizar el mismo protocolo, es decir, se despolarizó a la neurona por 5 segundos y se registró la corriente durante 5 min y por último se despolarizó una vez más la neurona palidal durante 10 s registrando las corrientes 15 minutos después. Cabe mencionar que todos los registros se obtuvieron en presencia de CNQX y AP5 observando los siguientes resultados.

En la Figura 11 A se muestra el trazo representativo de las IPSCs en condiciones basales, usando la solución interna con alto contenido de EGTA (10 mM), posteriormente, se realizó el DSI durante 5 s donde no se observaron cambios en la frecuencia de las IPSCs. Más adelante se repitió el mismo procedimiento despolarizando a la neurona durante 5 s en la cual observamos resultados similares al evento pasado, es decir, no hay cambio notorio en la frecuencia de las IPSCs. Por último se realizó el DSI cambiando el tiempo de despolarización a 10 s, donde se observa una depresión transitoria pero significativa en la frecuencia con respecto a la condición control.

En la Figura 11B, se muestra la curva temporal del porcentaje de cambio de frecuencia de las IPSCs espontáneas que representa el promedio de cinco neuronas. En esta figura se puede ver que después de la despolarización se presenta una ligera disminución pero no significativa del porcentaje de frecuencia. El mismo fenómeno se observa después del segundo evento despolarizante. Finalmente el porcentaje de cambio de las frecuencias se modificó cuando se despolarizó a la neurona durante 10 segundos observando un decremento ligero pero significativo en la frecuencia con respecto a las condiciones basales con recuperación después de 4 min de haber realizado el DSI.

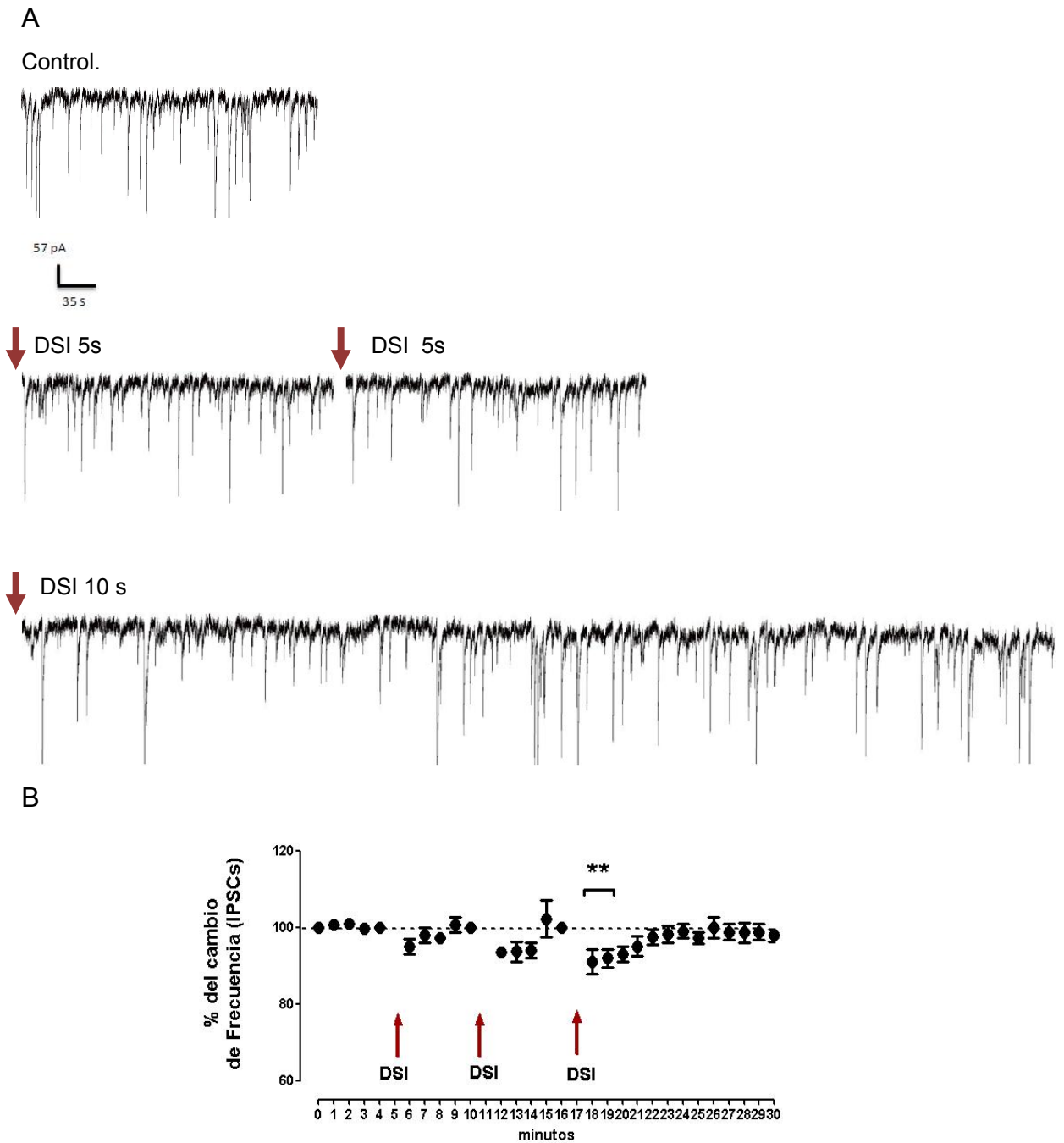


FIGURA 11. Efecto del DSI en condiciones de alto EGTA y diferentes tiempos de despolarización en el GPe . En A) Trazos representativos de las IPSCs espontáneos en diferentes condiciones. B) Curva temporal del porcentaje del cambio de frecuencia donde se muestra que no hay cambio significativo en el porcentaje después del primer y segundo evento despolarizante por 5 s (flecha roja) (valor máximo de inhibición 95.08 y 93.60 % con respecto al control $p < 0.001$; "Análisis de varianza de una vía" $n = 5$). En el tercer evento (minuto 15) se muestra una ligera pero significativa inhibición en el porcentaje de frecuencia (valor máximo de inhibición 91.01 % con respecto al control $p < 0.001$; "Análisis de varianza de una vía" $n = 5$).

Después se decidió a realizar el mismo procedimiento experimental usando una solución interna con bajo contenido de EGTA (0.5 Mm) para quelar menos el calcio y facilitar la síntesis y liberación de endocannabinoides. En la Figura 12 A se muestra el trazo representativo de las IPSCs control, posteriormente, se realizó el DSI durante 5 s donde se observó cambios en la frecuencia de las IPSCs con una recuperación gradual a lo largo de los 5 min de registro. Más adelante se repitió el mismo procedimiento despolarizando a la neurona durante 5 s en la cual observamos resultados similares al evento pasado. Por último se realizó el DSI cambiando el tiempo de despolarización a 10 s, donde se observa un cambio notorio en la frecuencia con respecto a la condición control sin recuperación a lo largo del registro.

En la Figura 12B, se muestra la curva temporal del porcentaje de cambio de frecuencia de las IPSCs espontáneas que representa el promedio de cinco neuronas. En esta figura se puede ver que después de la despolarización se presenta una ligera disminución pero significativa del porcentaje de frecuencia. El mismo fenómeno se observa después del segundo evento despolarizante. Finalmente el porcentaje de cambio de frecuencias cambió cuando se despolarizó a la neurona durante 10 s observando un decremento notorio del 9 % y a largo plazo en la frecuencia con respecto a las condiciones basales.

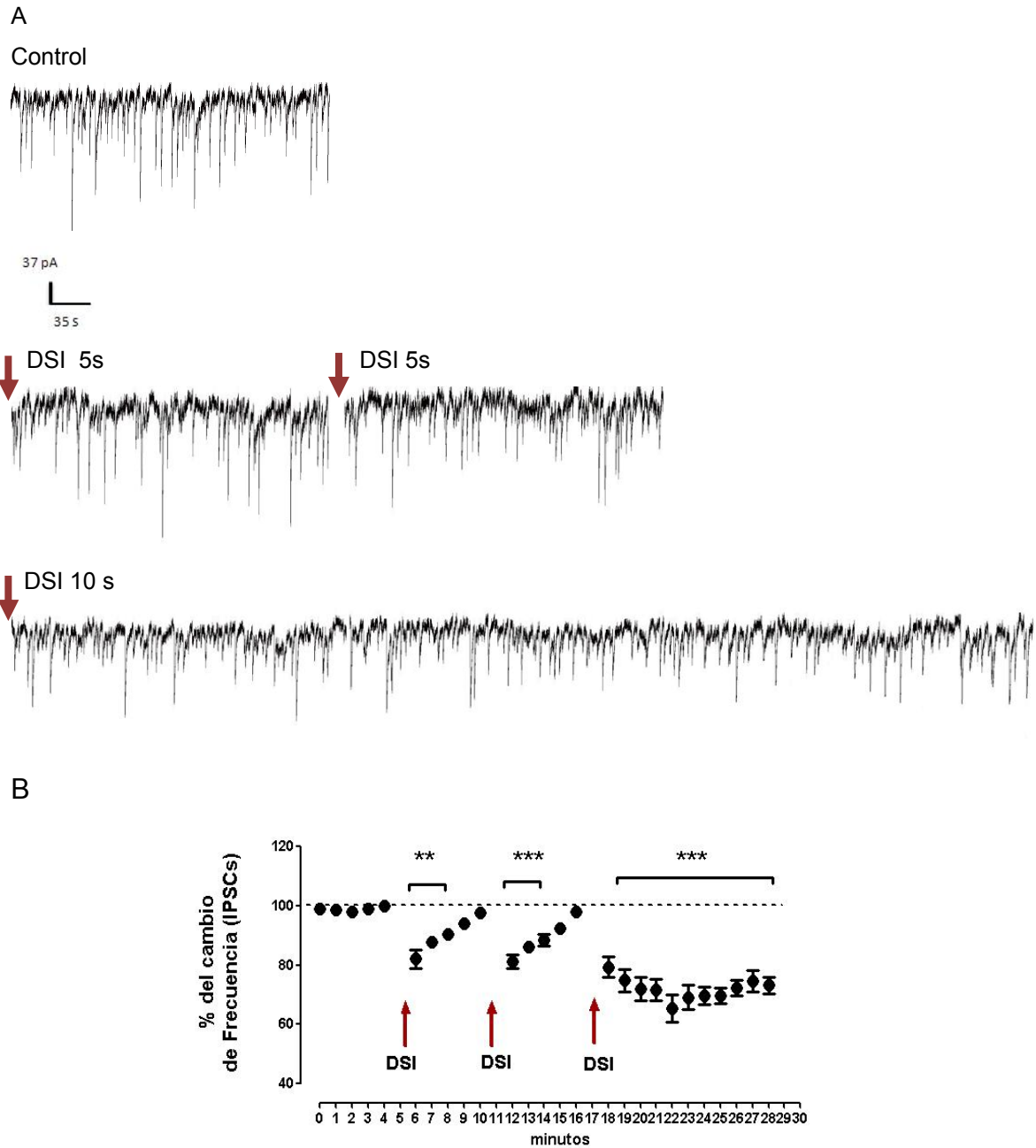


FIGURA 12. Efecto del DSI en condiciones de bajo EGTA y diferentes tiempos de despolarización en el GPe. En A) Trazos representativos de las IPSCs espontáneos en diferentes condiciones. B) Curva temporal del porcentaje del cambio de frecuencia donde se muestra que un ligero y transitorio cambio significativo en el porcentaje después del primer y segundo evento despolarizante por 5 segundos (flecha roja) (valor máximo de inhibición 82.07 y 81.07 % con respecto al control $p < 0.001$; "Análisis de varianza de una vía" $n=5$). En el tercer evento (minuto 15) se muestra un decremento significativo y a largo plazo del % de la frecuencia (valor máximo de inhibición 65.01 % con respecto al control $p < 0.001$; "Análisis de varianza de una vía" $n=5$).

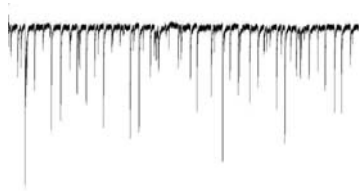
9.4 EFECTO DE LOS ENDOCANABINOIDES Y RECEPTORES CB1 SOBRE LA FRECUENCIA DE LAS IPSCs ESPONTÁNEAS EN NEURONAS DEL GPe

Decidimos usar la solución con bajo contenido de EGTA (0.5 mM) y 10 s de despolarización ya que bajo estas condiciones observamos una respuesta más clara, Sin embargo se quiso corroborar que esta respuesta en el decremento del porcentaje de frecuencia a largo plazo se debe a la activación del receptor CB1 por acción de los endocannabinoides liberados por DSI. Por lo tanto, el protocolo consistió en medir las IPSCs espontáneas por un periodo de cinco minutos, posteriormente se despolariza la neurona por 10 s (-60 a 0 mV) y por último se registra las corrientes después del evento despolarizante. Cabe mencionar que todos los registros se obtuvieron en presencia de CNQX y AP5 observando los siguientes resultados: en la Figura 13A se muestra el trazo representativo de corriente GABAérgica de una neurona que responde ante el pulso despolarizante (DSI), es decir, se observa como disminuye la amplitud y la frecuencia de IPSCs espontáneas con respecto a la condición control sin recuperación aparente a medida que pasa el tiempo de registro. A partir de los registros obtenidos, se analizó minuto a minuto las IPSCs espontáneas para cada una de las neuronas puestas a prueba donde se obtuvo el valor de la frecuencia y amplitud. El valor de la frecuencia control se normalizó al 100% y con base a ese valor, se pudo obtener el porcentaje de inhibición por cada minuto para cada condición experimental. Posteriormente se aplicó la prueba estadística de comparación múltiple de Bonferroni para el análisis y así determinar el nivel de significancia para cada una de las condiciones. En la figura 13 B, círculos negros, se muestra la curva temporal del porcentaje de cambio de frecuencia de las IPSCs espontáneas que representa el promedio de ocho neuronas que respondieron ante el pulso despolarizante con respecto a una condición control. En esta figura se puede ver que después de la despolarización disminuye casi un 40 % del efecto máximo de las

frecuencias sin recuperación aparente después de 15 min de registro, Sin embargo no se observó cambios significativos en la amplitud de las IPSCs.

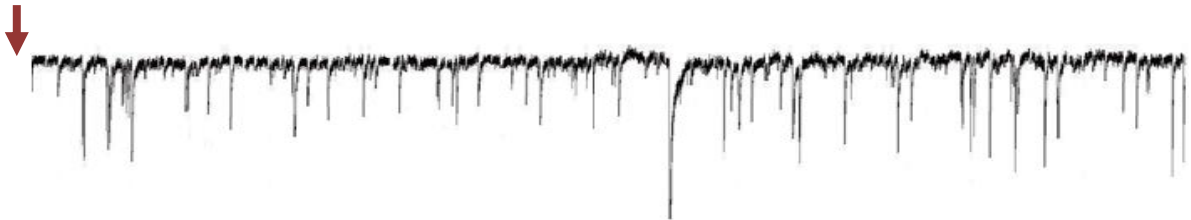
A

CONTROL



47 pA
35 s

DSI



B

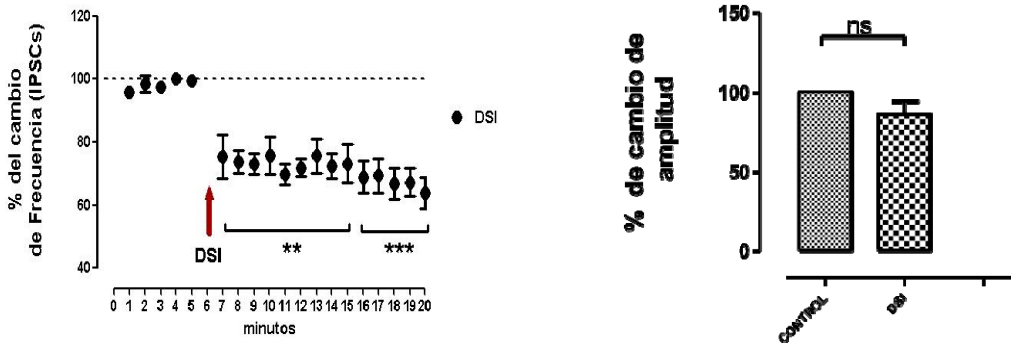


FIGURA 13. Efecto del DSI disminuye la frecuencia de IPSCs espontáneas en el GPe. En A) Trazos representativos de las IPSCs espontáneas 5 minutos antes y 15 minutos después del DSI. B) Curva temporal del porcentaje del cambio de frecuencia donde se muestra una disminución en el porcentaje después del DSI (flecha roja) (valor máximo de inhibición 63.87 % con respecto al control $p < 0.001$; "Análisis de varianza de una Vía" $n = 8$) y los valores de % del cambio de amplitud sin observar cambio significativo (Valor máximo 92% con respecto al control; "T de student" $n = 8$).

Para corroborar que el DSI en GPe es mediado por endocannabinoides y la activación del receptor CB1, se procedió a administrar AM 251 (90 nM), un antagonista de los receptores CB1 al baño de la preparación. En experimentos realizados en el laboratorio se demostró que AM 251 por si solo no tiene efecto alguno sobre la liberación de GABA en rebanadas de GPe. Por esa razón decidimos administrar el antagonista antes de registrar a la neurona para asegurarnos que el fármaco este bloqueando a los receptores. En la figura 14 A, se muestra el trazo representativo de una neurona que no responde ante el DSI, es decir, no hay cambio en la amplitud y frecuencias de las IPSCs espontáneas después del evento despolarizante con respecto a la condición control.

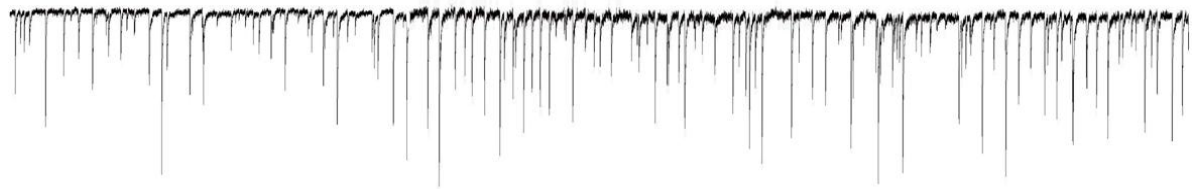
En la Figura 14B, se muestra la curva temporal que representa el promedio de las frecuencias de ocho neuronas puestas a prueba en presencia de AM 251. En esta figura se puede ver que después de la despolarización la frecuencia de las IPSCs permanecen sin cambios significativos (valor máximo de inhibición: 95.97 %) durante los 15 min de registro al igual que la amplitud de las corrientes (valor máximo de inhibición: 98.27 %).

A

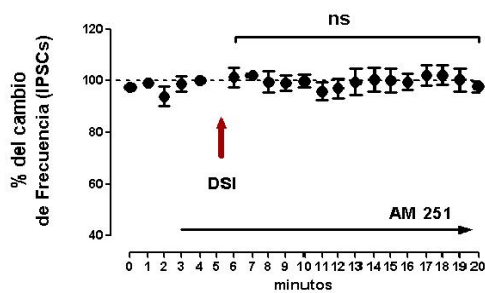
AM 251



DSI + AM 251



B



C

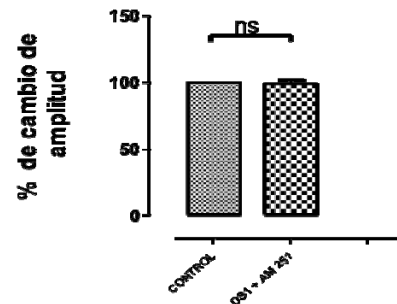


FIGURA 14. Los endocannabinoides liberados por DSI disminuyen la frecuencia de las IPSCs espontáneas. En A) Trazos representativos de las IPSCs espontáneas 5 min antes y 15 min después del DSI. B) Curva temporal del porcentaje del cambio de frecuencia donde se muestra que no hay cambio significativo en el porcentaje después del DSI (valor máximo de inhibición 95.97 % con respecto al control $p < 0.001$; "Análisis de varianza de una vía" $n = 8$). En C) Gráfica de barras del cambio del % de amplitud de las IPSCs registradas en medio control y durante el DSI en presencia de AM251 sin efecto después del DSI (valor máximo de inhibición 98.27 % con respecto al control $p < 0.001$; "T de Student" $n = 8$).

9.5 LA COACTIVACIÓN DE RECEPTORES DE LA FAMILIA D2 Y CB1 PREVIENE EL EFECTO INHIBITORIO DE LOS ENDOCANABINOIDES EN EL GPe

Una vez que se determinó el efecto de la activación de los receptores CB1, se quiso estudiar el efecto de la coactivación de receptores D2 like y CB1 sobre las IPSCs en GPe. Estudios realizados en el laboratorio han demostrado que la coactivación de los receptores D2 y CB1 estimula la liberación de [³H]-GABA en rebanadas de GPe. Si la coactivación de receptores de la familia D2 y CB1 previene el efecto inhibitorio de los endocannabinoides por DSI sobre las IPSCs, un agonista de los receptores D2 *like* nos permitirá ver esta respuesta. Por lo tanto, en esta serie de experimentos se empleó quinpirol (10µM), un agonista selectivo de la familia de receptores D2, después de registrar las IPSCs GABAérgicas en condiciones basales. Cabe mencionar que en todos estos experimentos se emplearon los bloqueadores ionotrópicos a glutamato desde el inicio del registro.

En la Figura 15A se muestra el primer trazo representativo de las IPSCs espontáneas de una neurona antes de adicionar el fármaco. Después de cinco minutos de registro, se adicionó quinpirol (10µM) al baño de la preparación donde se observa como va disminuyendo la frecuencia de las IPSCs a medida que transcurre el tiempo. Después de 10 min de registrar esas corrientes, se procedió a realizar el DSI, en la cual se observa como la frecuencia y la amplitud de las IPSCs son similares a la condición basal. Cabe mencionar que el agonista quinpirol también estuvo presente desde el momento de la despolarización hasta el final del experimento.

Después de obtener los registros de cada una de las neuronas, se analizaron los eventos registrados, minuto por minuto, de las IPSCs espontáneas para obtener el valor de la frecuencia y amplitud. Los valores de la frecuencia y amplitud pertenecientes al grupo control se normalizaron al 100% y, con base en su valor, se pudo obtener el valor del porcentaje para

cada condición experimental, es decir, el valor en porcentaje de la frecuencia y amplitud de las IPSCs en presencia de quinpirol y después del DSI. Posteriormente se aplicó la prueba estadística de comparación múltiple de Bonferroni para el análisis de frecuencia y así determinar el nivel de significancia estadística para cada una de las condiciones similar a los experimentos pasados. En la figura 15B, se muestra el curso temporal del porcentaje del cambio de frecuencia de las IPSCs espontáneas que representa el promedio de siete neuronas, en donde se observa el efecto inhibitorio y gradual de quinpirol (10 μ M) sobre la frecuencia de las IPSCs (efecto máximo de inhibición 57.42%). Este efecto inhibitorio es reversible después del DSI, es decir, la frecuencia de las IPSCs no son significativas con respecto a la condición basal después del evento despolarizante (efecto máximo de recuperación 113.03%). Por otro lado, no hubo cambio en las amplitudes para cada uno de los tratamientos.

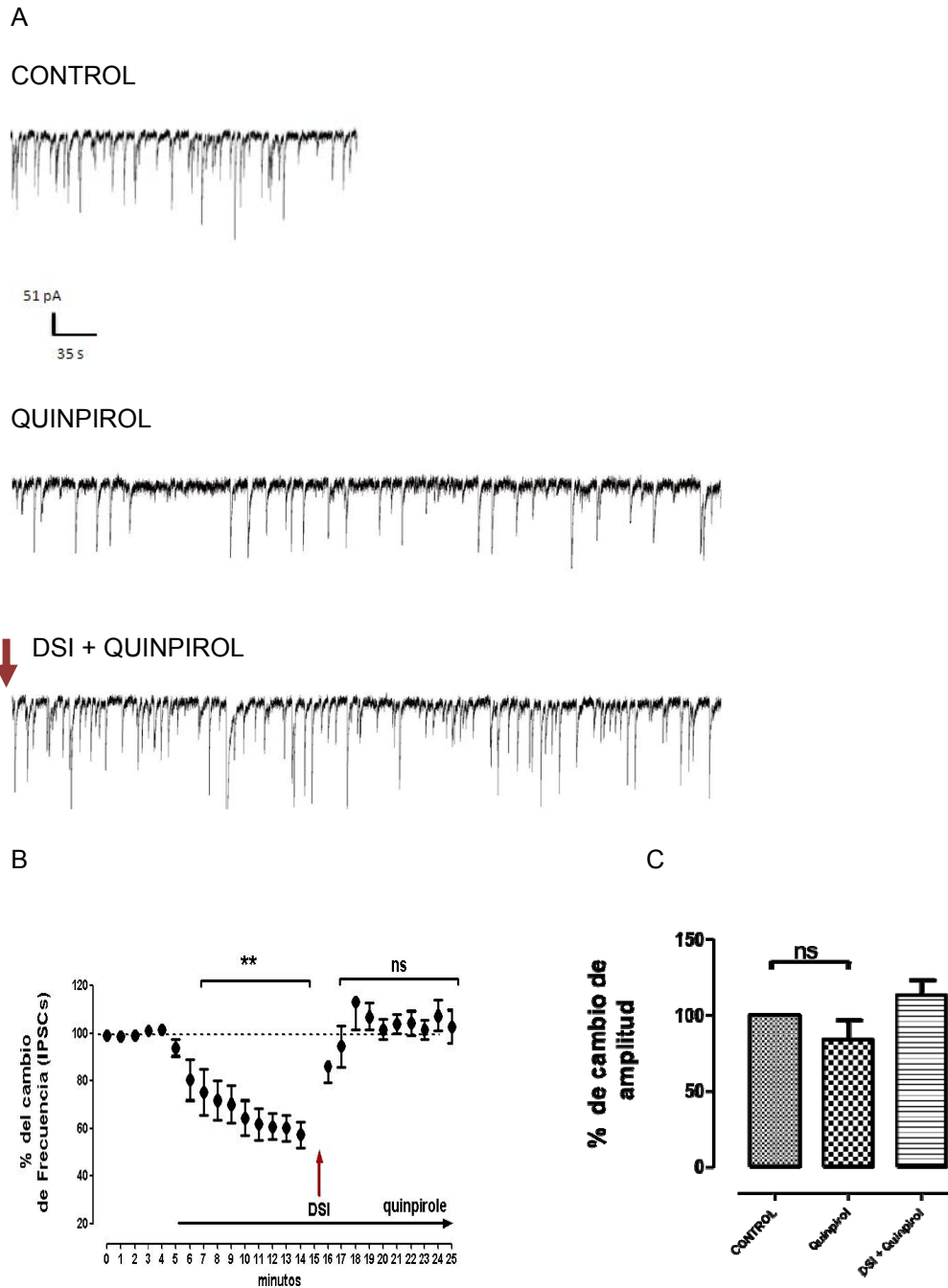


FIGURA 15. Efecto de la coactivación de receptores D2 like y CB1 sobre la frecuencia de las IPSCs espontaneas en GPe. En A) Trazos representativos de las IPSCs espontáneos en las diferentes condiciones. B) Curso temporal del porcentaje del cambio de frecuencia donde se muestra el efecto inhibitorio de quinpirol (10 μ M) en la IPSCs comparado con las corrientes control (valor máximo de inhibición 57.42% control $p < 0.01$; "Análisis de varianza de una vía" $n=8$). Después del minuto 15 se muestra la recuperación de las IPSCs después de la despolarización. En C) no hubo cambio significativo en el porcentaje de amplitud control con respecto de Quinpirol y DSI + Quinpirol (valor máximo de inhibición 91.30 % con respecto al control $p < 0.01$; "Análisis de varianza de una vía" $n=8$).

Para corroborar que el efecto inhibitorio de las IPSCs se previene cuando se co activan los receptores CB1 y D2 *like* se procedió a administrar AM 251 (90 nM) al baño de la preparación aunado a quinpirol (10 μ M) después de 5 min de registro. El bloqueo del receptor CB1 teóricamente prevendrá la estimulación. En la figura 16A, se muestra el trazo representativo de una neurona antes de adicionar los fármacos. Después de cinco minutos de registro, se adicionó quinpirol y AM 251 al baño de la preparación donde se observa como va disminuyendo la frecuencia y la amplitud de las IPSCs a medida que transcurre el tiempo. Después de 15 min de registro y en presencia de los fármacos, se procedió a realizar el DSI, en donde se observa como la frecuencia y la amplitud de las IPSCs permanece sin cambios.

Una vez que se obtuvo el promedio del porcentaje de frecuencia para cada condición experimental de cada neurona, se procedió a realizar el análisis estadístico. En la figura 16B, se muestra la curva temporal del porcentaje de cambio de frecuencia de las IPSCs espontáneas que representa el promedio de ocho neuronas, en donde se observa el efecto inhibitorio y gradual de quinpirol sobre la frecuencia de las IPSCs (efecto máximo de inhibición 61.33%). Este efecto significativo de casi un 40 % de inhibición no fue reversible después del DSI, es decir, la frecuencia de las IPSCs siguen siendo significativas con respecto a la condición basal (efecto máximo de inhibición 57.11%).

Estos resultados indican que la coactivación de los receptores D2 *like* y CB1 de las recurrentes colaterales previenen el efecto inhibitorio del receptor CB1 y D2 *like* cuando se activan de manera independiente.

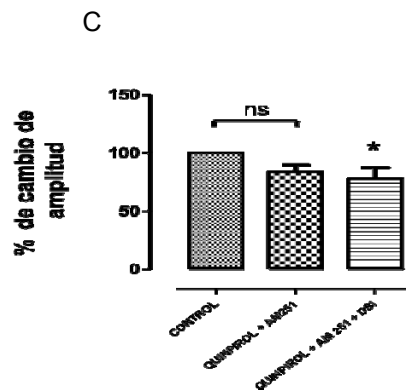
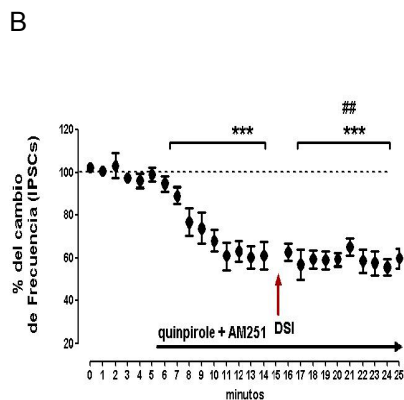
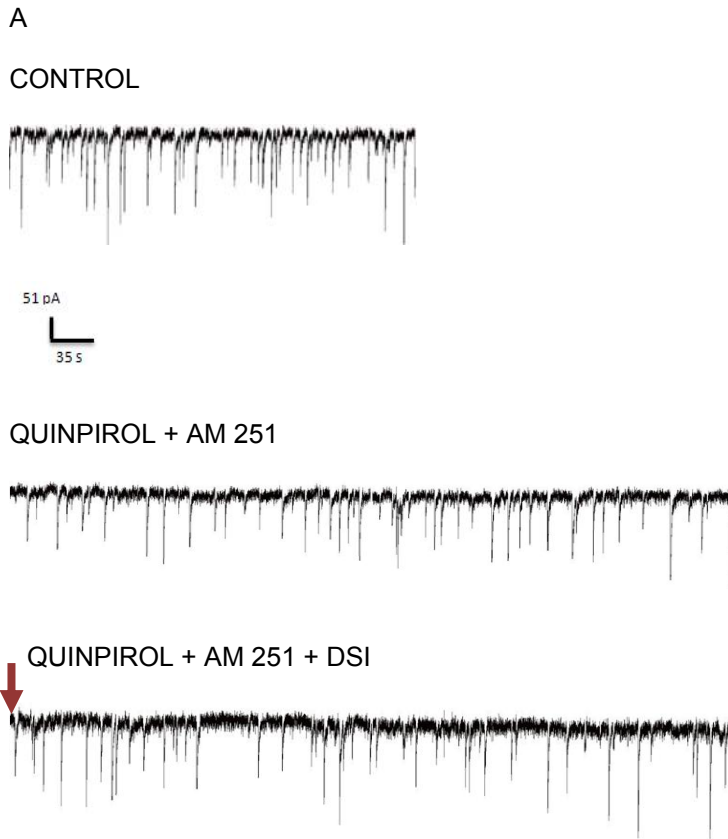


FIGURA 16. Efecto de la coactivación de receptores D2 like y CB1 sobre la frecuencia de las IPSCs espontaneas en GPe en presencia de un antagonista selectivo al receptor CB1. En A) Trazos representativos de las IPSCs espontaneas en las diferentes condiciones. B) Curva temporal del porcentaje del cambio de frecuencia donde se muestra el efecto inhibitorio de quinpirol (10 μ M) en la IPSCs comparado con las corrientes control (valor máximo de inhibición 61.33% con respecto al control $p < 0.001$; "Análisis de varianza de una Vía" $n=8$). Después del minuto 15 no se muestran cambios en las IPSCs después del DSI. En C) no hubo cambio significativo en el porcentaje de amplitud de Quinpirol y AM 251 (valor máximo de inhibición 93.30 % con respecto al control $p < 0.01$; "Análisis de varianza de una vía" $n=8$). Sin embargo si lo hubo en la condición de Quinpirol y AM 251+ DSI (valor máximo de inhibición 85.33% con respecto al control $p < 0.001$; "Análisis de varianza de una vía" $n=8$).

9.6 LA RESPUESTA FACILITATORIA DE LAS IPSCs POR LA COACTIVACIÓN DE RECEPTORES DE LA FAMILIA D2 Y CB1 DEPENDEN DE INCREMENTOS EN LA ACTIVIDAD DE PKA

Después de observar que la coactivación de los receptores CB1 y D2 *like* previene el efecto inhibitorio de los endocannabinoides sobre las IPSCs espontáneos en rebanadas GPe, se procedió a investigar la vía de señalización que podría estar involucrada en este efecto. Por lo tanto lo primero que se realizó fue estudiar la vía clásica de AC → AMPc → PKa ya que se ha demostrado que la coactivación de los receptores, D2 y CB1, conducen a un aumento en la síntesis de AMPc (Glass y Felder; 1997) y para ello, se bloqueó a la PKA con su inhibidor selectivo H89 a una concentración de 10µM. En la Figura 17A se muestra el trazo representativo de una neurona en presencia de H89. Estudios adicionales realizados en nuestro laboratorio han demostrado que H89 no tiene efecto alguno sobre la liberación de GABA en rebanadas de GPe por esa razón, decidimos adicionar el bloqueador desde el inicio del registro. Posteriormente, después de 5 min de haber registrado la corriente basal, se adicionó Quinpirol (10µM) al baño de la preparación donde se observa cómo va disminuyendo la frecuencia y la amplitud de las IPSCs a medida que transcurre el tiempo. Más adelante, como se ha realizado en los experimentos pasados, se procedió a hacer el DSI después de 15 min de registro donde se observó que la frecuencia de IPSCs no presentan cambios.

Posteriormente se estudió la coactivación de los receptores CB1 y D2 *like* en presencia de H89 por medio de los análisis de corriente y el porcentaje de cambio de frecuencia a través de la curva temporal echa como se describió anteriormente. En la gráfica 17B, se muestra la curva temporal del porcentaje de cambio de frecuencia que representa el promedio de ocho neuronas, en donde se observa el efecto inhibitorio y gradual de quinpirol y H89 sobre la frecuencia de las IPSCs efecto máximo de inhibición 62.82%

con respecto al control). Este efecto significativo no fue reversible después del DSI, es decir, la frecuencia de las IPSCs siguen siendo bajas con respecto a la condición basal efecto máximo de inhibición 45.73%).

Por lo tanto, se observa que el efecto estimulador en la IPSCs promovido por la coactivación de los receptores de la familia D2 y CB1 con Quinpirol (10mM) y DSI respectivamente, se ve afectada por el bloqueo de la PKA.

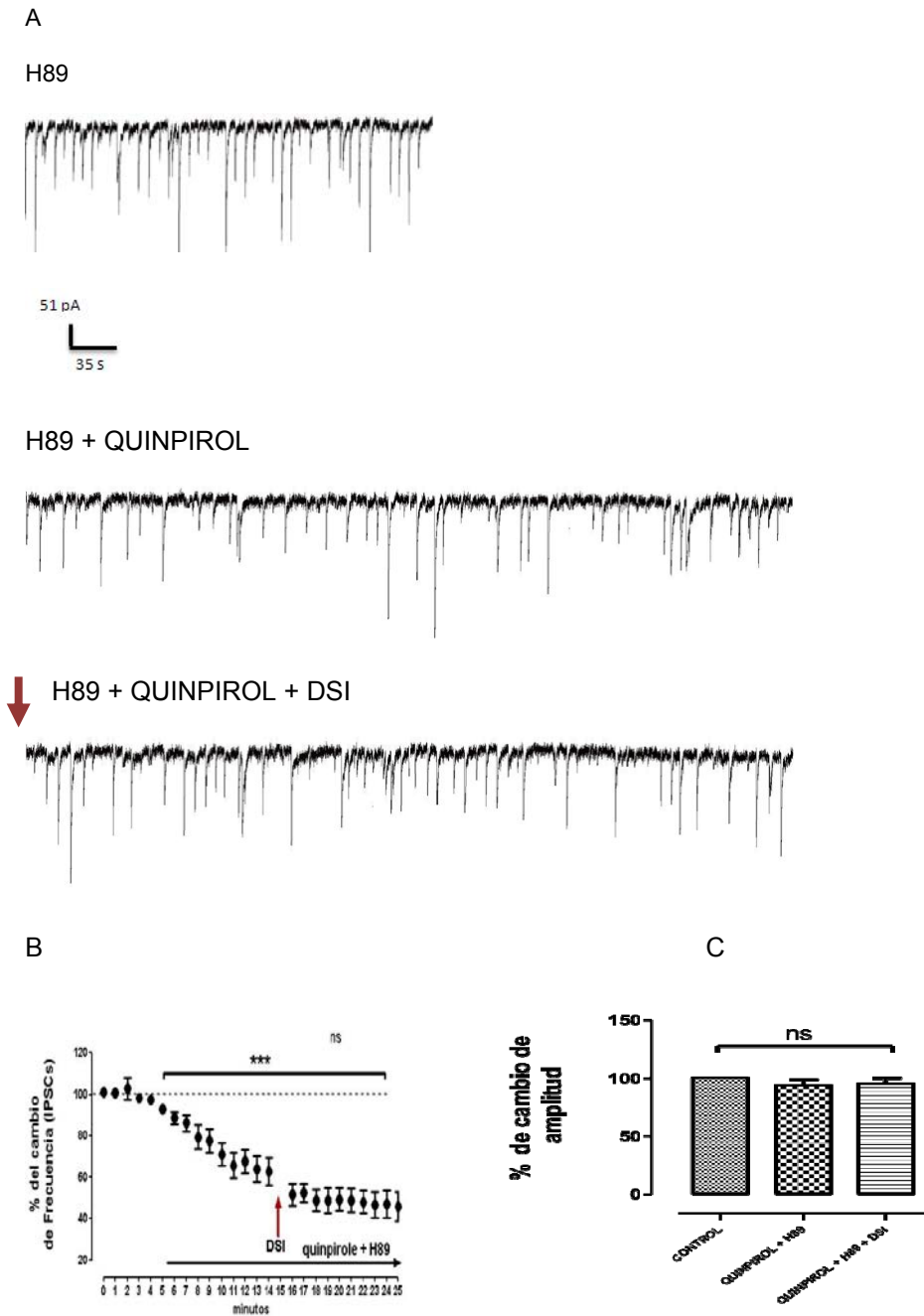


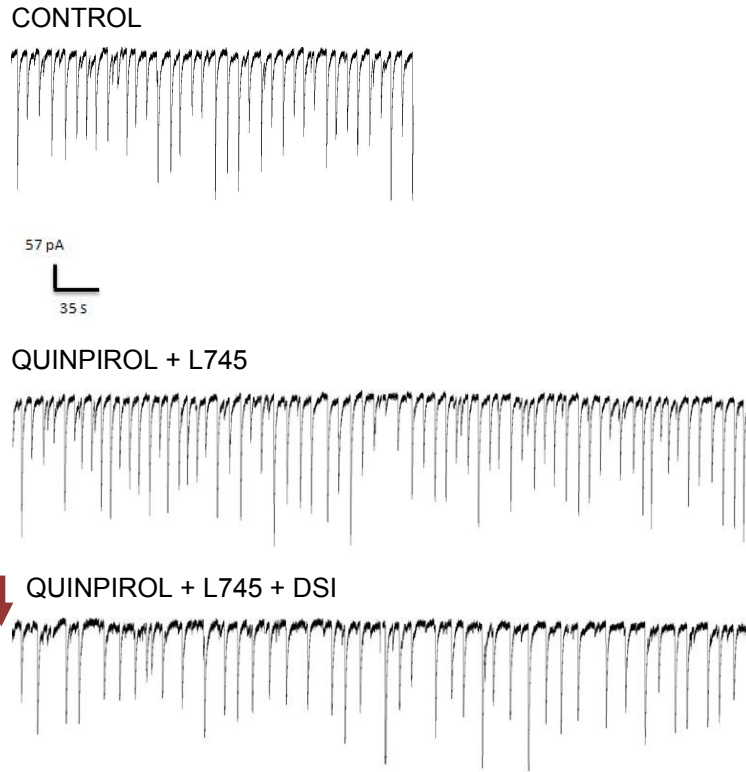
FIGURA 17. Efecto de la coactivación de receptores D2 like y CB1 sobre la frecuencia de las IPSCs espontáneas en GPe en presencia de un antagonista selectivo a la PKa. En A) Trazos representativos de las IPSCs espontáneas en las diferentes condiciones. B) Curso temporal del porcentaje del cambio de frecuencia donde se muestra el efecto inhibitorio de quinpirol (10 μ M) en la IPSCs comparado con las corrientes control (valor máximo de inhibición 62.82% con respecto al control $p < 0.001$; "Análisis de varianza de una Vía" $n = 8$). Después del minuto 15 no se muestran cambios en la las IPSCs después del DSI (valor máximo de inhibición 45.73% con respecto al control $p < 0.001$; "Análisis de varianza de una Vía" $n = 8$). En C) no hubo cambio significativo en el porcentaje de amplitud de Quinpirol y H 89 Y Quinpirol + H89 + DSI (valor máximo de inhibición 94.20 y 95.04 %con respecto al control $p < 0.01$; "Análisis de varianza de una vía" $n = 8$)

9.7 LA COACTIVACIÓN DE RECEPTORES CB1 Y D4 DE LAS RECURRENTE COLATERALES DEL GPe PREVIENEN EL EFECTO DE LOS ENDOCANABINOIDES

Una vez que demostramos el efecto inhibitorio de la activación del receptor CB1 por DSI sobre la IPSCs en el GPe de ratón y que este efecto se previene cuando se coactivan con receptores D2 *like* dependiente de incrementos en la actividad de PKA, el siguiente paso fue determinar qué tipos de receptores D2 *like* están involucrados en la respuesta ya que la familia de estos están representados por el receptor D2, D3 y D4, respectivamente. Se ha demostrado previamente que el receptor D4 se expresa abundantemente tanto en el soma como en terminales de las neuronas del GPe (Hernandez, et al; 2006, Acosta; 2010) además las IPSCs espontáneas en neuronas de este núcleo se debe, básicamente, a la liberación cuántica de GABA proveniente de colaterales ya que las neuronas estriatales son silentes en rebanadas (Kita et al; 2010). Por esta razón se decidió usar L 745 (500 nM) un antagonista específico del receptor D4 en esta serie de experimentos.

En la figura 18A se muestra el trazo representativo de una neurona en condiciones basales. Después de 5 min de haber registrado la corriente basal, se adicionó quinpirol (10 μ M) en presencia de L 745,870 (500nM) al baño de la preparación donde se observa que la frecuencia y la amplitud de las IPSCs aparentemente no son afectadas por quinpirol a medida que transcurre el tiempo. Mas adelante, se procedió a realizar el DSI después de 15 min donde se observó que la frecuencia de las IPSCs disminuye. En la gráfica 18 B, se muestra la curva temporal del porcentaje de cambio de frecuencia que representa el promedio de siete neuronas, en donde no se observa efecto inhibitorio de quinpirol sobre la frecuencia de las IPSCs. Este efecto se vio afectado después del DSI, es decir, la frecuencia de las IPSCs son bajas con respecto a la condición basal.

A



B

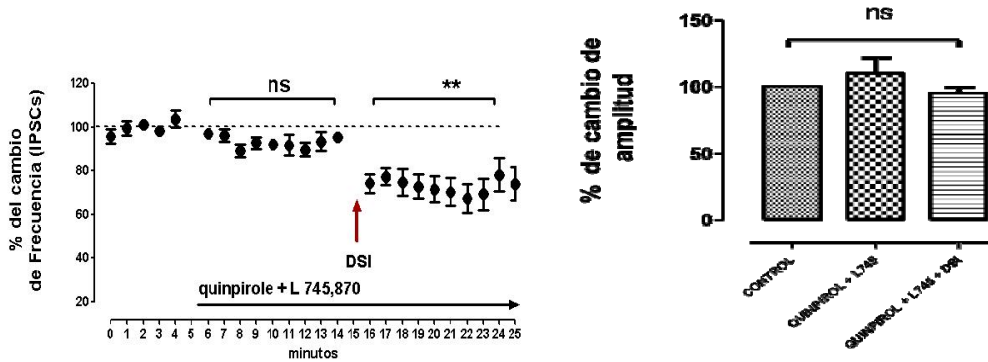


FIGURA 18. Efecto de la coactivación de receptores D2 like y CB1 sobre la frecuencia de las IPSCs espontaneas en GPe en presencia de un antagonista selectivo a la PKA. En A) Trazos representativos de las IPSCs espontaneos en las diferentes condiciones. B) Curva temporal del porcentaje del cambio de frecuencia donde se muestra el efecto inhibitorio de quinpirol (10 μ M) en la IPSCs comparado con las corrientes control (valor máximo de inhibición 62.82% con respecto al control $p < 0.01$; "Análisis de varianza de una vía" $n=8$). Después del minuto 15 no se muestran cambios en la las IPSCs después del DSI (valor máximo de inhibición 45.73% con respecto al control $p < 0.01$; "Análisis de varianza de una vía" $n=8$).

10. DISCUSIÓN

10.1 EFECTO DE LA CONCENTRACION DE CALCIO INTRACELULAR EN LA RESPUESTA MEDIADA POR ENDOCANABINOIDES.

En los GB, la despolarización de las neuronas postsinápticas conduce a la activación de los receptores CB1 presinápticos mediado por los endocannabinoides que, subsecuentemente, suprime la liberación de GABA y/o glutamato. Este fenómeno de depresión sináptica puede ser a corto plazo (Matyás, et al; 2006) y/o a largo plazo (Pan et al; 2008; Ronesi , et al; 2004).

Estudios adicionales realizados en nuestro laboratorio han demostrado que el empleo de agonistas selectivos del receptor CB1 puede suprimir la liberación de [³H]GABA en rebanadas de GPe de rata (González, et al; 2009) además, los endocannabinoides liberados por DSI en GPe inhiben las IPSCs evocadas (Engler et al; 2006). Sin embargo, los primeros efectos solo son visibles en presencia de agonistas farmacológicos del receptor CB1 en concentraciones elevadas y la respuesta de los endocannabinoides en las IPSCs evocadas no fue importante. Esto último puede ser el resultado de la poca cantidad de endocanabinoide liberado en la maniobra experimental, sobre todo por la alta concentración de EGTA usada por estos autores. Por lo tanto, nuestro primer objetivo fue ver si este efecto inhibitorio en la liberación de GABA puede ser reproducido por los agonistas endógenos liberados por DSI en el GPe a través del registro de las IPSC espontáneas utilizando una solución interna con EGTA (10 mM), similar a la solución usada por el grupo de Engler (2006), y otra con concentraciones más bajas del quelante (EGTA 0.5 mM) a diferentes tiempos de despolarización. Los datos que se obtuvieron muestran que, con la solución intracelular estándar de EGTA 10 mM, el DSI de 5 s conduce a una ligera disminución, pero no significativa en el porcentaje de frecuencia de las IPSCs

espontáneas cuyo efecto es reversible (Figura 11). El efecto fue significativo y reversible cuando el DSI se prolongó por 10 s. En esta condición de poco Ca^{2+} intracelular (quelado por el EGTA) la producción de los endocannabinoides en la supresión de IPSCs pudiera verse compensada por la duración del pulso de voltaje que se induce (Lenz and Alger; 1999). Consideramos por ello un efecto claro en el DSI podría requerir grandes y prolongados aumentos en la concentración de Ca^{2+} intracelular ya que la cinética intrínseca de este catión es lenta (Zhou y Neher, 1993). Por lo tanto, el quelante utilizado en concentraciones milimolares en experimentos de DSI, pudo haber afectado la dinámica del Ca^{2+} y por tanto el DSI. Esto consideramos fue lo que llevó a concluir a Engler y sus colaboradores (2006) que la producción de endocannabinoides por el DSI era pobre.

Por otro lado, en experimentos donde se emplearon concentraciones de EGTA 0.5 mM se observó un efecto claro y duradero después del pulso despolarizante (Figura 12). La reducción intracelular de EGTA mejoró enormemente la capacidad del pulso de voltaje breve (5s) para provocar DSI y con pulsos más largos producen una mayor respuesta. En experimentos de Morishita y colaboradores (1999) observaron que el pulso de voltaje con duración de 0.186 s produce la mitad del efecto máximo del DSI con solución interna que contiene 0.1 mM de BAPTA, sin embargo, el efecto máximo del DSI se logró con un pulso de voltaje de 1.37 s en neuronas hipocampales (Morishita y Alger; 1999. Lenz y Alger; 1999). Este fenómeno observado en hipocampo es similar en GPe, en la cual la duración del pulso y la cantidad de EGTA afecta el DSI que, finalmente, influyen en la dinámica del Ca^{2+} y la síntesis de endocanabinoide.

La respuesta obtenida en mejores condiciones experimentales no fue reversible en los periodos de tiempo observados, produciendo lo que llamaríamos una depresión sináptica de largo plazo. Una probable explicación puede deberse a la cantidad elevada de endocanabinoide

presente en la hendidura sináptica, que eventualmente active de manera prolongada a una gran cantidad de receptores CB1 de las colaterales del GPe, la cual, induciría, pero no mantendría, el fenómeno de depresión sináptica a largo plazo (LTD) como ocurre en el estriado (Ronesi, et al; 2004), ya que la lipofiliidad y el transporte podrían remover el endocanabinoide. Probablemente, la señalización de los endocanabinoides se da en un periodo de tiempo limitado, durante y unos minutos después del DSI. En experimentos realizados en estriado se demostró que la activación de CB1 es necesaria para la inducción, pero no mantenimiento, de la LTD, (Ronesi, et al; 2004). Para corroborar que este fenómeno también ocurre en el GPe, se pretenden hacer experimentos en la cual, una vez establecido la LTD, se perfunda el antagonista 10 minutos después del DSI. Se espera que no haya cambio en la frecuencia de las IPSCs. Por lo tanto, si esto ocurre podríamos aportar evidencia de que el receptor de cannabinoides en GPe estaría participando en esta forma de plasticidad que se desencadena por una vía de señalización que detone la LTD en un periodo de tiempo muy corto. De hecho, para la plasticidad a largo plazo, en otras regiones del SNc se ha visto que el mecanismo predominante requiere la inhibición prolongada de la AC y la regulación a la baja de la vía cAMP / PKA vía la subunidad α i/o (Chevalleyre et al, 2006;. Heifets y Castillo, 2009). Mientras que para plasticidad a corto plazo, se requiere que el receptor CB1 se active durante unos segundos, el mecanismo implica la dependencia de la proteína G (probablemente a través de las subunidades β y γ) la inhibición directa de los canales de Ca^{2+} presinápticos dependientes de voltaje (Brown et al. , 2003; Kreitzer y Regehr, 2001;. Wilson et al, 2001).

10.2 LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES CB1 Y D4 INHIBEN LA FRECUENCIA DE LAS IPSCs ESPONTÁNEAS EN NEURONAS DEL GPe.

En las terminales nerviosas de las neuronas del GPe y en sus recurrentes colaterales, se expresan abundantemente los receptores CB1 (Mátyás, et al; 2006) Las IPSCs espontáneas registradas en las neuronas palidales, básicamente son mediadas por GABA que proviene de las colaterales de la misma estirpe neuronal, ya que las neuronas del estriado son silentes en rebanadas (Matsui, and Kita; 2003). Si el protocolo de DSI de 10 s usando una solución interna con bajas concentraciones de quelante induce a una disminución progresiva e irreversible de las IPSCs, entonces los endocannabinoides liberados por DSI detonan este efecto cuando activan al receptor CB1 de la terminal. La participación de los receptores CB1 se realizó empleando su antagonista selectivo AM 251 que se perfundi6 antes del registro. Nuestros datos a partir del análisis de 8 neuronas nos dicen que en presencia del antagonista no modifico el porcentaje de frecuencia de las IPSCs espontáneas *per se* lo cual sugiere que no hay un tono canabinoide de manera normal, pero si previene la inhibición de los cambios de frecuencia producidos por el DSI lo que indica que el receptor a canabinoide es el principal responsable.

La activación de receptores de D2-like disminuye la frecuencia de los sIPSC de las rebanadas de globo pálido (Figura 15). Este efecto aparentemente esta mediado solo por receptores de la familia D4, ya que la perfusión del antagonista D4 altamente selectivo previno todo el efecto inhibitorio producido por el quinpirole (figura 18). Este hallazgo es consistente con los antecedentes de función y ubicación de los receptores D4 presinapticos en los GB que ocurre en los núcleos de proyección de las neuronas palidales como el reticular del tálamo (Erlj et al; 2012), la sustancia *nigra pars reticulata* (Acosta et al; 2009), y el subtálamo (Floran, et al; 2004), en este

caso este estudio indica su localización también en las recurrentes colaterales.

10.3 LA COACTIVACION DE RECEPTORES CB1 Y D4 CONVIERTE LA RESPUESTA INHIBITORIA EN ESTIMULATORIA A TRAVÉS DE LA VIA ADENILIL CICLASA → AMPc → PKA

La co-activación de los receptores CB1 y D2 puede tener distintos efectos potenciales sobre la transducción de señales. En los sistemas heterólogos y en cultivos de neuronas estriatales, la co-activación farmacológica de los receptores CB1 y D2 cambia la vía de señalización de la proteína G i/o convencional de uno de uno de los receptores, es decir, la conversión de la vía Gi /o por la via Gs por parte del receptor CB1 (Glass y Felder, 1997; Kearn et al ., 2005), facilitando así, en lugar de reducir, la liberación del neurotransmisor y/o la formación de AMPc. También existe la posibilidad de interferencia sinérgica o antagónica entre los sistemas de receptores en la presinápsis (Marcellino et al, 2008). Sin embargo, otros trabajos han demostrado que la activación de los receptores D2 con bajas dosis de quinpirol puede facilitar la LTD inhibitoria mediada por los endocannabinoides en la corteza prefrontal (Chiu, et al; 2010) y en área ventral tegmental (Pan; et al; 2008) a través de la inhibición de la PKA por debajo de niveles umbrales, producto de la cooperación de ambos receptores acoplados a proteínas G i/o. De la misma manera, se ha planteado la posibilidad de una dimerización de los receptores usando proteínas Gs como efector, en un sistema que además requiere la coactivación de ambos receptores.

Estudios realizados en nuestro laboratorio han reportado que la coactivación de receptores CB1-D2, en las terminales estriado-palidales, puede estimular la liberación de GABA por la vía de la AC-AMPc-PKA (González et al, 2009). Este efecto novedoso cambia radicalmente el concepto clásico de la acción de los endocannabinoides sobre la liberación de neurotransmisor ya que el efecto de la coactivación CB1-D2 son opuestos a los que produce la

activación de esos receptores por separado que es la de inhibir la liberación de GABA. Las hipótesis propuestas para explicar este fenómeno de la facilitación en la liberación de GABA en el globo pálido, son que el receptor CB1 cambie su acople de proteínas G i/o a Gs, ya que el receptor D2 al activarse es más afín por las proteínas Gi/o en el microdominio y por tanto evita que el receptor CB1 las use. Otra de las hipótesis propuestas es que formen un heterómero durante la coactivación y que este use la vía de señalización que facilite la liberación de GABA.

En este trabajo se aportó evidencia experimental del tipo electrofisiológico, que nos indica que en las recurrentes colaterales de GPe, se presenta este fenómeno de la facilitación de neurotransmisor tal y como ocurre en las terminales estriado-palidales. Nuestros datos indican que la activación de los receptores CB1 por DSI y D2- *like* con agonistas no selectivos puede inhibir la IPSCs espontáneas en el GPe por separado a través del receptor ya que al bloquear al receptor CB1 con AM 251 y D4 con L745, 870 este efecto en la inhibición de las IPSCs no se presenta (figura 14 y 17). Lo mismo indican que la coactivación produce una respuesta estimuladora similar a la observada en las terminales estriado-nigrales.

Otra similitud observada es la vía de señalización evocada por separado y en la coactivación. Las vías de señalización clásica propuestas para explicar estos efectos son la inhibición de la vía AC-AMPC-PKA, y/o el bloqueo de canales de Ca^{+2} por las subunidades $\beta\gamma$ de la proteína Gi/o a las que se acoplan como se ha demostrado en otros núcleos (Howlett et al 2005, Heifets y Castillo, 2009). Como ocurre en los experimentos neuroquímicos, la coactivación de los receptores CB1-D4 vuelve estimulador el efecto mediado por los endocannabinoides y quinpirol por separado, de la IPSCs. De acuerdo a lo propuesto el receptor CB1 cambia su acople de proteínas G i/o a Gs cuando los receptores D2-*like*, D4 en este caso estén activos, entonces el incremento en la liberación del neurotransmisor pueda ser ocasionado por

un incremento en la síntesis de AMPc lo cual conduciría a un incremento de la actividad de la PKA que eventualmente favorezca la liberación de GABA cuando se fosforilen los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. El bloqueo del efecto estimulador por el inhibidor de la PKA es compatible con este postulado sería muy interesante conocer si la coactivación de CB1-D4 de las recurrentes del GPe también promueve el aumento en la formación de AMPc.

Una evidencia experimental que permitiría suponer la participación de las proteínas Gs cuando se activa el receptor CB1, sería el bloqueo selectivo de las proteínas Gi/o con la toxina pertussis y/o con el agente sulhidril alquilante (NEM), de tal manera que si hay un incremento en las IPSCs espontáneos cuando se active el receptor probablemente este participando la proteína Gs, como se ha mostrado en la interacción del CB1 con el D2 de vía estriado-palidal. El enfoque va dirigido al receptor CB1 que estaría mediando la vía de señalización durante la coactivación ya que es este receptor es el que se ha involucrado en la formación de dímeros y el único de los dos que se ha mostrado acople a proteínas Gs (Glass y Felder 1997, Ferré et al., 2009). Para ver la formación de heterómeros CB1 y D4 estudios de coinmunoprecipitación son una herramienta útil para ayudar a resolver esta duda, lo mismo que los estudios de proximidad de ligandos.

En resumen estos resultados sugieren que la estimulación en las IPSC espontáneos por coactivación de los receptores CB1-D4, en el GPe es un efecto en el que interviene la vía de señalización AC-AMPc-PKA, similar a la coactivación CB1-D2 en terminales estriado palidales.

11. CONCLUSIONES

La producción de endocannabinoides inducidos por el DSI en neuronas palidales activa receptores CB1 presinápticos de las recurrentes colaterales palido-palidales que inhiben la liberación de GABA. La producción y efecto es dependiente de la concentración de Ca^{2+} intracelular.

La activación de receptores D4 de recurrentes colaterales palidales también inhibe la liberación de GABA.

La coactivación de receptores CB1 Y D4 estimula la liberación de GABA de las recurrentes colaterales a través de activación de la vía Adenilil ciclasa → AMPc → PKA.

12. BIBLIOGRAFÍA

Acosta, G; Hernández Chan, N; Paz, F; Sierra, A; Erij, D; Aceves, J; Florán B. "D4 and D1 dopamine receptors modulate [3H] GABA release in the substantia nigra pars reticulata of the rat". *Neuropharmacology*. 57(7-8):725-30.

Akaoka, H; Charley, P; Saunier, C; Buda, M; Chouvet, G. (1992). "Inhibition of nigral dopamine neurons by systemic and local apomorphine: possible contribution of dendritic autoreceptor". *Neuroscience*. 49:879-91.

Beaulieu J; Gainetdinov, R. (2011). "The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors". *Pharmacol Rev*. 63(1):182-217.

Blandini, F; Nappi, G; Tassorelli, C; Martignoni, E. (2000). "Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease". *Prog Neurobiol*. 62(1):63-88.

Brown, A. (2007). "Novel cannabinoid receptors". *J Pharmacol*. 152(5):567-75.

Chaves Kirsten ,G; Mazucanti, C; Real, C; Souza, B; Britto, L; Torráo, A. (2013). "Temporal changes of CB1 cannabinoid receptor in the basal ganglia as a possible structure-specific plasticity process in 6-OHDA lesioned rats". *PLoS One*. 8(10): e76874.

Centonze D, Battista N, Rossi S, Mercuri NB, Finazzi-Agro A, Bernardi G, Calabresi P, Maccarrone M. (2004). "A critical interaction between dopamine D2 receptors and endocannabinoids mediates the effects of cocaine on striatal GABAergic transmission. *Neuropsychopharmacology*. 29:1488–1497.

Chevalyere, V; Castillo, P. (2003). "Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: a novel role of endocannabinoids in regulating excitability". *Neuron* 38, 461–472.

Chiu, C; Puente, N; Grandes, P; Castillo, P. (2010) "Dopaminergic modulation of endocannabinoid-mediated plasticity at GABAergic synapses in the prefrontal cortex". *J Neurosci*. May 26;30(21):7236-48.

Cooper, A and Stanford, I. (2000). "Electrophysiological and morphological characteristics of three subtypes of rat globus pallidus neurone in vitro". *J Physiol*. (2) 291-304.

De Petrocellis, L; Di Marzo, V. (2012). "An introduction to the endocannabinoid system: from theory to the latest concepts". *Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 23 (2012) 1–15.

Di Marzo, V; Petrocellis, L. (2011). "Why do cannabinoid receptors have more than one endogenous ligand?". *Phil. Trans. R. Soc. B*. 367, 3216–3228.

Engler, B; Freiman, I; Urbanski, M; Szabo, B. (2006). "Effects of Exogenous and Endogenous Cannabinoids on GABAergic Neurotransmission between the Caudate-Putamen and the Globus Pallidus in the Mouse". *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 316:608–617.

Erij D; Acosta J; Rojas M; González B; Escartín E; Aceves J; Florán B. (2012). "Dopamine D4 receptor stimulation in GABAergic projections of the globus pallidus to the reticular thalamic nucleus and the substantia nigra reticulata of the rat decreases locomotor activity". *Neuropharmacology*. 62(2):1111-8.

Felder, C; Joyce, K; Briley, E; Glass, M; Mackie, K; Fahey, K; Cullinan, G; Hunden, D; Johnson, D; Chaney ,M; Koppel, G; Brownstein ,M. (1998). "LY320135, a novel cannabinoid CB1 receptor antagonist, unmasks coupling of the CB1 receptor to stimulation of cAMP accumulation". *J Pharmacol Exp Ther*. 284(1):291-7.

Ferré, S; Goldberg, S; Lluís, C; Franco, R. (2009). "Looking for the role of cannabinoid receptor heteromers in striatal function". *Neuropharmacology*. 1:226-34.

Fezza, F; Bari, M; Florio, R; Talamonti, E; Feole, M; Maccarrone, M. (2014). "Endocannabinoids, Related Compounds and Their Metabolic Routes". *Molecules Review*. 19, 17078-17106.

Floran, B; Floran, L; Erij, D; Aceves, J. (2004). "Dopamine D4 receptors inhibit depolarization-induced [3H]GABA release in the rat subthalamic nucleus". *J Pharmacol*. 13;498(1-3):97-102.

Gabriela, P; Chaves, K; Caio, H; Mazucanti, Y; Caroline, C; Bruna, M; Souza, L; Britto, Andréa S. (2004). "Temporal Changes of CB1 Cannabinoid Receptor in the Basal Ganglia as a Possible Structure-Specific Plasticity Process in 6-OHDA Lesioned Rats". *J Physiol*. 15;521 Pt 1:147-57.

Glass, M; Felder, 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(14):5327-33.

Gonzalez, B.; Paz, F.; Floran, L.; Aceves, J.; Erij, D., and Floran, B. (2009). "GABA release in the globus pallidus of the rat when G(i) protein-receptor coupling is restricted: role of dopamine D2 receptors". *J Pharmacol Exp Ther*. 328(3):822-8.

Hernández, A; Ibáñez-Sandoval, O; Sierra, A; Valdiosera, R; Tapia, D; Anaya, V; Galarraga, E; Bargas, J; Aceves, J. "Control of the subthalamic innervation of the rat globus pallidus by D2/3 and D4 dopamine receptors". *J Neurophysiol*. 96(6):2877-88.

Hoffman, A; Lupica, C..(2000). "Mechanisms of cannabinoid inhibition of GABA(A) synaptic transmission in the hippocampus". *J*.20(7):2470-9.

Heifets, B; Castillo, P. (2009). "Endocannabinoid signaling and long-term synaptic plasticity". *Rev. Physiol*. 71, 283–306.

Hermann, H; 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* 109:451–460.

Howlett, A; Barth, F; Bonner, T; Cabral, G; Casellas, P; Devane, W. (2002). "Classification of cannabinoid receptors". *Pharmacol Rev*. 54:1161–202.

Jaber, M; Robinson, S; Missale, C; Caron, M. (1996). "Dopamine receptors and brain function". *Neuropharmacology*. 35:1503-19.

Jackson, D; Westlind-Danielsson, A. (1994). "Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioral aspects". *Pharmacol Ther*. 64: 291-369.

Jarrahan, A; Watts, V; Barker, E. (2004). "D2 dopamine receptors modulate Galpha-subunit coupling of the CB1 cannabinoid receptor". *J Pharmacol Exp Ther*. 308:880–886.

Jung, K; Mangieri, R; Stapleton, C; Kim, J; Fegley, D; Wallace, M; Mackie, K; Piomelli, D. (2005). "Molecular Stimulation of Endocannabinoid Formation in Brain Slice Cultures through Activation of Group I Metabotropic Glutamate Receptors". *Molecular Pharmacology*. 68:1196-1202.

Kano, M; Ohno-Shosaku, T; Hashimoto-dani, Y; Uchigashima, M; Watanabe, M. (2009). "Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission". *Physiol. Rev*. 89, 309–380.

Kearn, C; 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*. 67:1697–1704.

Kita, H; Kitai, S. (1994). "The morphology of globus pallidus projection neurons in the rat: an intracellular staining study". *Brain Res.* 636(2):308-19.

Kreitzer, A; Regehr, W. (2001). "Cerebellar Depolarization-Induced Suppression of Inhibition Is Mediated by Endogenous Cannabinoids". *The Journal of Neuroscience.* 21: 1 – 5.

Kearn, C; 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.* 67:1697–1704.

Lenz, R; Alger, B. (1999). "Calcium dependence of depolarization-induced suppression of inhibition in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons". *J Physiol.* 15;521 Pt 1:147-57.

Llano, I; Leresche, N; Marty, A. (1991) "Calcium entry increases the sensitivity of cerebellar Purkinje cells to applied GABA and decreases inhibitory synaptic currents". *Neuron.* 6(4):565-74.

Lledo, P; Homburger, V; Bockaert, J; Vincent, J. (1992). "Differential G protein-mediated coupling of D2 dopamine receptor to K⁺ and Ca²⁺ currents in rat anterior pituitary cells". *Neuron.* 8:455-63.

Lujan, R; Roberts, D.; Shigemoto R; Ohishi, H; Somogyi, P. (1997). "Differential plasma membrane distribution of metabotropic glutamate receptors mGluR1 alpha, mGluR2 and mGluR5, relative to neurotransmitter release sites". *J. Chem. Neuroanat.* 13, 219.

Matsui, T; Kita, H. (2003). "Activation of group III metabotropic glutamate receptors presynaptically reduces both GABAergic and glutamatergic transmission in the rat globus pallidus" *Neuroscience.* 122(3):727-37.

Mackie, K. (2005). "Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system". *Handb Exp Pharmacol.* (168):299-325.

Mátyás, F; Yanovsky, Y; Mackie, K; Kelsch, W; Misgeld, U; Freund, T. (2006). "Subcellular localization of type 1 cannabinoid receptors in the rat basal ganglia" *Neuroscience.* 137(1):337-61.

Marcellino, D; Carriba, P; Filip, M; Borgkvist, A; Frankowska, M; Bellido, I; Tanganelli, S; Muller, C; Fisone, G; Lluis, C; Agnati, L; Franco, R; Fuxe, K. (2008). "Antagonistic cannabinoid CB1/dopamine D2 receptor interactions in striatal CB1/D2 heteromers. A combined neurochemical and behavioral analysis". *Neuropharmacology.* 54:815–823.

Morishita, W; Alger, B. (1999). "Evidence for endogenous excitatory amino acids as mediators in DSI of GABA(A)ergic transmission in hippocampal CA1". *J Neurophysiol.*

Obeso, J. A.; Rodriguez-Oroz, M. C.; Rodriguez, M.; Arbizu, J., and Gimenez-Amaya, J. M. The basal ganglia and disorders of movement: pathophysiological mechanisms. *News Physiol Sci.* 2008 Apr; 17:51-5.

Pan, B; Hillard, C, Liu, Q. (2008). "D2 dopamine receptor activation facilitates endocannabinoid-mediated long-term synaptic depression of GABAergic synaptic transmission in midbrain dopamine neurons via cAMP-protein kinase A signaling". *J Neuroscience.* 28(52):14018-30

Parent, A; Lévesque, M; Parent, M. (2001). "A "re-evaluation of the model of the basal ganglia". *Parkinsonism y Related disorders.* 7,193-198.

Perkins, M, Stone, T. (1980). "Subthalamic projections to the globus pallidus: an electrophysiological study in the rat". *Exp Neurol.* 68(3):500-11.

Pitler, T; Alger, B. (1992). "Postsynaptic spike firing reduces synaptic GABA responses in hippocampal pyramidal cells". *J Neurosci.* (10):4122-32.

- Prensa ,L; Parent, A. (2006). "Morphological features of neurons containing calcium-binding proteins in the human striatum". *J Comp Neurol*. 390(4):552-63.
- Querejeta,E; Delgado, A; Valdiosera, R; Erlij, D; Aceves,J. (2001). "Intrapallidal D2 dopamine receptors control globus pallidus neuron activity in the rat". *Neurosci Lett*. 300(2):79-82.
- Ronesi, J; Gerdeman, G; Lovinger, D. (2004). "Disruption of endocannabinoid release and striatal long-term depression by postsynaptic blockade of endocannabinoid membrane transport". *J Neurosci*. 24(7):1673-9.
- Schmid, P, Reddy, P; Natarajan, V; Schmid, H. (1983). "Metabolism of N-acyl ethanolamine phospholipids by a mammalian phosphodiesterase of the phospholipase D type". *J Biol Chem*. 10;258(15):9302-6.
- Smith, Y; Bolam ,J. (1989). "Neurons of the substantia nigra reticulata receive a dense GABA-containing input from the globus pallidus in the rat". *Brain Res*. 24;493(1):160-7.
- Sugiuraf, T; Kobayashi, Y; Oka, S; Waku, K. (2002). "Biosynthesis and degradation of anandamide and 2-arachidonoylglycerol and their possible physiological significance". *Leukotrienes and Essential FattyAcids*. 66(2y3),173-192.
- Svíženskáa, I ; Dubovya, P; Šulcováb, A. (2008). "Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures". *Review Pharmacology Biochemistry and Behavior*. (4) 501–511.
- Wilson, R; Nicoll, R. (2001). "Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses". *Nature* . 410:588–592.
- Yanovsky, Y; Mades, S; Misgeld, U. (2003). "Retrograde signaling changes the venue of postsynaptic inhibition in rat substantia nigra". *Neuroscience*. 122:317–328.
- Zhou, Z; Neher, E. (1993). "Mobile and immobile calcium buffers in bovine adrenal chromaffin cells". *Journal of Physiology*. 469, 245—273.