

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**“Papel de los receptores D1 y la adenilil ciclasa sobre la liberación de GABA
estimulada por receptores GPR55 en la vía estriato-nigral.**

T E S I S

Que presenta

MCyP. ANTONIO VALENTÍN GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

Director de la Tesis:

Dr. BENJAMÍN FLORÁN GARDUÑO

Ciudad de México

Noviembre, 2018

Este trabajo se realizó gracias al apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), en el laboratorio 4 del departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional.

A mi familia que siempre me ha apoyado.

A mi madre por todo su cariño.

Y a mi padre que siempre me alentó a seguir mis sueños.

Índice.

1. Introducción.	13
1.1 Ganglios Basales.	13
1.1.1 Estriado (Caudado-Putamen).	14
1.1.2 Globo Pálido.	14
1.1.3 Núcleo Subtalámico.	15
1.1.4 Sustancia Nigra.	15
1.1.5 Sustancia nigra <i>pars compacta</i> .	15
1.1.6 Sustancia nigra pars reticulata	15
1.2 Vía directa e indirecta.	16
1.3 Los Canabinoides y el sistema endocanabinoide.	17
1.3.1 Receptor CB1	19
1.3.2 Receptor CB2	20
1.3.3 Receptor GPR55	21
1.4 Receptores para dopamina D1 y su acople a la vía AC-AMPC-PKA por medio de una proteína $G\alpha_{olf}$.	25
2 Planteamiento del problema.	27
3 Hipótesis.	30
4 Objetivo general.	30
4.1 Objetivos particulares.	30
5 Material y métodos.	31

5.1	Obtención de la sustancia <i>nigra pars reticulata</i> (SNr).	31
5.2	Depleción de la dopamina endógena con reserpina.	31
5.3	Fármacos utilizados.	31
5.4	Liberación de [³ H] GABA.	32
6	Resultados.	34
6.1	La dopamina endógena no está implicada en la liberación de GABA estimulada por la activación del receptor GPR55.	34
6.2	El bloqueo de los receptores D1 no modifica la liberación de GABA por la activación del receptor GPR55.	35
6.3	La adenilil ciclasa V no está implicada en la liberación de GABA por la activación del receptor GPR55 en ratas reserpinizadas.	37
6.4	La inhibición de PKC no previene la liberación de GABA por la activación del receptor GPR55.	39
6.5	La inhibición de la sub-unidad βγ previene la liberación de GABA por la activación del receptor GPR55.	40
6.6	Ara-A previene la liberación de GABA por la activación del receptor GPR55.	41
7	Discusión.	42
8	Conclusión.	46

9 Perspectivas. 47

10 Bibliografía. 48

Abreviaturas

[³H] GABA	GABA triteado
2-AG	2-araquidonilglicerol
A₂A	Receptor para adenosina
ABCC1	Casete de unión a ATP, subfamilia C, miembro 1
ACs	Adenilil ciclasas
AEA	Anandamida
AMPc	Adenosin 3,5-monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosin trifosfato
CA1	Cuerno de Amón 1
Ca²⁺	Ion calcio
CaCl₂	Cloruro de calcio
CB1	Receptor a cannabinoides tipo 1
CB2	Receptor a cannabinoides tipo 2
CB3	Receptor a cannabinoides tipo 3

D1	Receptor a dopamina 1
DAG	D-1,2-Diacilglicerol
DAGL	Diacilglicerol lipasa
DMSO	Dimetilsulfóxido
ERK	Quinasas reguladas por señal extracelular
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GAT	Transportador de GABA
GIRK	Canal de potasio rectificador entrante acoplado a proteína G
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G
GPe	Globo pálido externo
GPI	Globo pálido interno
GPR55	Receptor acoplado a proteína G 55
K⁺	Ion potasio
KCl	Cloruro de potasio
KH₂PO₄	Fosfato de potasio

LPI	L- α -lisofosfatidilinositol
LPS	Lisofosfolípido
MgSO₄	Sulfato de magnesio
MSN	Neuronas espinosas medianas
NAPE-PLD	N-acilfosfatidiletanolaminafosfolipasa D-específica
NaCl	Cloruro de sodio
NaHCO₃	Bicarbonato de sodio
NAT	N-acetiltransferasa
NST	Núcleo subtalámico
PDB	Banco de datos de proteínas
PKA	Proteína quinasa A
PI	Fosfatidilinositol
PKC	Proteína quinasa C
PL	Fosfolípidos
PLA	Enzima fosfolipasa A
PLC	Enzima fosfolipasa C

RMSD	Desviación cuadrática media
SEC	Sistema Endocanabinoide
SNC	Sistema Nervioso Central
SNc	Sustancia nigra <i>pars compacta</i>
SNr	Sustancia nigra <i>pars reticulata</i>
TH	Tirosina hidroxilasa
vGLUT2	Transportador vesicular de glutamato 2

Resumen.

El receptor GPR55 es un receptor acoplado a proteínas G que se propuso como un tercer receptor a cannabinoides (CB3). Se ha observado en sistemas de transfección, que el receptor GPR55 induce la liberación de calcio intracelular a través de las vías $G\alpha_{12/13}/RhoA$ y $G\alpha_q/PLC$, y no aumenta los niveles de AMPc. Sin embargo nuestro grupo de trabajo mostró, en experimentos de liberación, en rebanadas de la SNr, que la liberación de GABA estimulada por el receptor GPR55 en terminales estriato-nigrales, no es modulada por el calcio de los compartimentos intracelulares y además, que la vía probable de señalización del receptor GPR55 es a través de AC-AMPc-PKA, lo que se contrapone con lo descrito hasta el momento. Lo observado por nuestro grupo de trabajo puede deberse a la activación de receptores D1 de las terminales estriato-nigrales, debido a la liberación de dopamina estimulada por receptores GPR55 presentes en dendritas de la SNc. El objetivo de este trabajo fue demostrar que la liberación de GABA en las terminales estriato-nigrales mediada por el receptor GPR55, depende de la activación de receptores D1 y de una enzima adenilil ciclasa. Para demostrarlo, realizamos experimentos de liberación de GABA en rebanadas de SNr, en ratas depletadas de dopamina, bloqueando a los receptores D1 e inhibiendo a la enzima adenilil ciclasa. Los resultados demuestran que el receptor D1 y la AC V no participan en la liberación de GABA mediada por el receptor GPR55 en las terminales estriato-nigrales. Sin embargo, antecedentes muestran que pudieran estar implicadas otras adenilil ciclasas, por ello realizamos experimentos de liberación inhibiendo la AC VII y la subunidad $\beta\gamma$ de la proteína G, la cual activa la AC VII. Se observó que la AC VII, activada por la subunidad $\beta\gamma$ probablemente de una proteína Gq pudiera estar implicada en la liberación de GABA estimulada por el receptor GPR55 en terminales estriato-nigrales.

Abstract.

GPR55 receptor is a G-protein coupled receptor that was proposed as third cannabinoid receptor (CB3). GPR55 induces calcium release through $G\alpha_{12/13}$ /RhoA and $G\alpha_q$ / PLC pathways, and does not increase cAMP levels in transfection systems. However, We seen that GABA release stimulated by GPR55 is not modulated to intracellular calcium in striato-nigral terminals, and the probable pathway is through CA-cAMP-PKA, all this is opposite to the background. This phenomenon may be due to the activation of D1 receptors in striato-nigral terminals, release of dopamine stimulated by GPR55 receptors present in SNc dendrites. The objective of this work was to demonstrate that release of GABA in striato-nigral terminals and GPR55 receptor, it does not depend to D1 receptors activation, but it depends to adenylyl cyclase enzyme. We perform experiments of GABA release in SNr slices, depleted dopamine rats, blocking D1 receptors and inhibiting the enzyme adenylyl cyclase in order to demonstrate it. The results show that D1 receptor and AC V do not participate in GABA release mediated by GPR55 in striato-nigral terminals. However background shows that other adenylyl cyclase may be involved, we perform release experiments inhibiting AC VII and $\beta\gamma$ fraction of G proteins, which activates AC VII. It was observed that AC VII activated by $\beta\gamma$ fraction could be involved in GABA release stimulation by GPR55 in striato-nigral terminals.

1. Introducción.

1.1 Ganglios Basales.

Los Ganglios basales son un conjunto de grupos celulares o núcleos subcorticales que forman un circuito neuronal y que se encargan principalmente del control motor, también se le han descrito otras funciones como es, el aprendizaje motor, el control del comportamiento y las emociones. Los ganglios basales están compuestos por varios núcleos; el núcleo caudado-putamen o estriado, el globo pálido, el núcleo subtalámico, la sustancia negra y el núcleo pedunculopontino los cuales forman un circuito neuronal que se divide en dos vías denominadas vía directa y vía indirecta y que comunican con el tálamo y estructuras corticales las cuales envían fibras a la médula espinal, para modular la ejecución del movimiento. También la corteza manda axones al estriado cerrando así el circuito neuronal (Fig. 1) (Lanciego et al. 2012). A continuación daremos un breve resumen de cada estructura que componen a los ganglios basales.

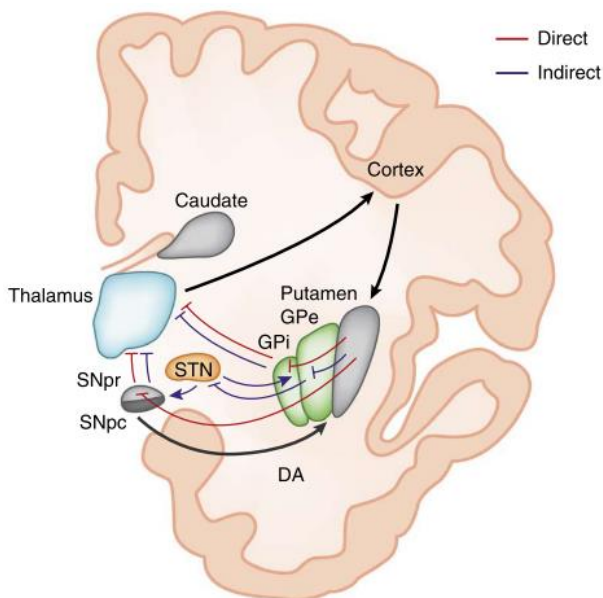


Figura 1: Esquema de los ganglios basales. Esquema que representa un corte sagital del cerebro donde se muestra la localización de las estructuras que conforman los ganglios basales y sus conexiones entre sí y otras estructuras. Las flechas representan las fibras excitatorias (glutamatérgicas) y las barras fibras inhibitorias (GABAérgicas). La vía directa está representada con líneas de color rojo y la vía indirecta de color azul (Calabresi et al. 2014).

1.1.1 Estriado (Caudado-Putamen).

El cuerpo estriado es la estructura de entrada de los ganglios basales. Podemos dividirlo en cuerpo estriado dorsal y ventral. El cuerpo estriado dorsal se divide para formar el núcleo caudado y el putamen en el humano, en roedores se encuentra formado por una sola estructura llamada neostriado. Este núcleo recibe información de índole glutamatérgico por parte de la corteza cerebral. Otra entrada importante que se dirige al estriado es de las células dopaminérgicas de la SNc y del área tegmental ventral (Bar-Gad et al. 2003). Celularmente el cuerpo estriado contiene dos tipos diferentes de neuronas: 90% son neuronas de proyección y el 10% interneuronas. Las neuronas de proyección o neuronas espinosas medianas (MSN) son neuronas GABAérgicas que inervan al GPe, formando la vía indirecta, y al GPi y la SNr formando la vía directa. Las interneuronas forman un circuito local y presentan diferentes características. El grupo más abundante de interneuronas consiste en neuronas que utilizan acetilcolina como neurotransmisor. Otro grupo de interneuronas son las neuronas GABAérgicas. Estas neuronas modulan la actividad de las neuronas MSN y a su vez, están bajo control dopaminérgico de las fibras que llegan de la SNc (Lanciego et al. 2012).

1.1.2 Globo Pálido.

EL globo pálido se divide en dos segmentos, el Gpe y Gpi (o núcleo entopeduncular en roedores) los cuales presentan neuronas GABAérgicas y estos reciben fibras GABAérgicas de las MSN (Utter et al. 2008). Las proyecciones del GPe se dirigen principalmente al NST y otras se dirigen a la SNr, mientras que las del Gpi, que es un núcleo de salida de los ganglios basales, envían fibras al tálamo. El Gpi recibe fibras glutamatérgicas por parte del NST que forma parte de la vía indirecta. El Globo pálido también recibe fibras dopaminérgicas provenientes de la SNr (Bar-Gad et al. 2003).

1.1.3 Núcleo Subtalámico.

El NST recibe proyecciones glutamatérgicas de la corteza frontal y las áreas somato motoras corticales (Monakow et al. 1978, Nambu et al. 1996) y fibras GABAérgicas del GPe. El NST es el único núcleo de los ganglios basales que tiene neuronas glutamatérgicas (excitatorias) las cuales envían sus fibras a ambos segmentos del globo pálido y a la SNr (Bar-Gad et al. 2003).

1.1.4 Sustancia Nigra.

Se pueden reconocer dos estructuras en la sustancia nigra, la sustancia nigra *pars compacta* que contiene células grandes y compactas de tipo dopaminérgicas y la sustancia nigra *pars reticulata* que son de índole GABAérgicas.

1.1.5 Sustancia nigra *pars compacta*.

La SNc está compuesta por células dopaminérgicas que se caracterizan morfológicamente por presentar una gran pigmentación (de ahí el término *nigra*) esto debido a la gran cantidad de melanina que contienen (Lanciego et al. 2012). Estas neuronas envían sus proyecciones principalmente al núcleo estriado, sin embargo, todos los núcleos de los ganglios basales presentan proyecciones provenientes de este núcleo (Utter et al. 2008). Así mismo, se han descrito varias proyecciones hacia a la SNc principalmente de origen GABAérgico provenientes del estriado y globo pálido externo (Ribak et al.1980).

1.1.6 Sustancia nigra *pars resticulata*

Las neuronas de la SNr son de carácter GABAérgico y es uno de los núcleos de salida de los ganglios basales. La SNr recibe fibras inhibitorias desde el estriado a

través de ambas vías, la directa y la indirecta (Utter et al. 2008), aunque también se ha descrito la llegada de fibras glutamatérgicas por parte del NST (Parent et al. 1995). La SNr junto con el Gpi son los principales núcleos de salida de los ganglios basales por lo que son un punto muy importante en la regulación del movimiento.

1.2 Vía directa e indirecta.

Como ya se mencionó, el estriado envía fibras al GPe, al GPi y a la SNr. Las eferencias del estriado se dividen en dos vías principales, la vía directa y la vía indirecta. La vía indirecta envía fibras al GPe, el cual está conformado por células GABAérgicas y este a su vez envía eferencias al núcleo subtalámico conformado por neuronas glutamatérgicas excitadoras, las cuales, presentan axones que llegan al GPi y a la SNr. La vía directa, como su nombre lo dice, envía axones de neuronas espinosas medianas directamente al GPi y a la SNr, los cuales son neuronas inhibitorias o GABAérgicas. Una forma de caracterizar y diferenciar entre ambas vías es la detección de sustancia P que se expresa en las MSN de la vía directa y de encefalina la cual se expresa en MSN de la vía indirecta, lo cual es muy útil al momento de querer diferenciar entre ambas vías. Otra diferencia importante es que la vía directa se caracteriza por expresar receptores a dopamina 1, los cuales se acoplan a una proteína $G\alpha_s$ (excitadoras), por otra parte, en la vía indirecta se expresan receptores a dopamina tipo 2 que se acoplan a una proteína $G\alpha_i$ (inhibidor). La activación de estos receptores es causada por la dopamina que es secretada por la sustancia *nigra pars compacta*, que envía axones hacia ambas vías participando así en la regulación de este circuito neuronal.

Por último, el GPi y la SNr que son neuronas de naturaleza GABAérgicas presentan proyecciones de salida de los ganglios basales hacia el tálamo que tiene neuronas glutamatérgicas que a su vez envían axones a la corteza frontal cerrando así el circuito (Fig. 2) (Calabresi et al. 2014). Todo este complejo circuito

juega un papel muy importante en el control de la motricidad, por lo que cuando se presentan defectos o alteraciones en este circuito podemos observar enfermedades como el Parkinson, el Huntington o el hemibalismo donde su principal afectación es de carácter motriz.

Como ya se mencionó, uno de los principales reguladores del circuito de los ganglios basales es el sistema dopaminérgico, sin embargo, en los últimos años se han descubierto otros receptores y moléculas que pudieran estar implicados en la regulación de este circuito, tal es el caso de los derivados de la *canabis sativa* y el sistema endocanabinoide.

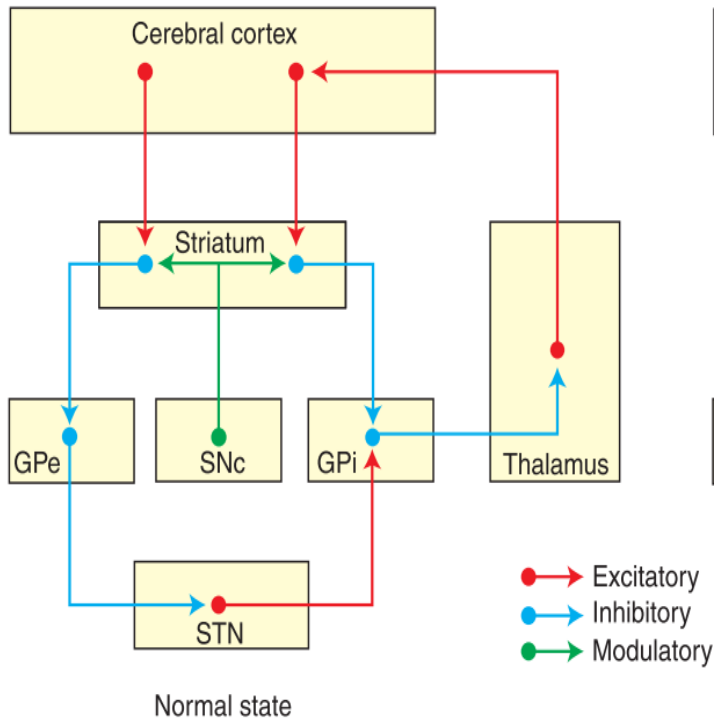


Figura 2: Circuito de los ganglios basales. Esquema donde se representa el circuito de los ganglios basales, las flechas rojas describen la neuronas excitadoras que se encuentran en corteza, subtálamo y tálamo; la azul las neuronas inhibitorias que se encuentran en estriado, Gpe, Gpi y SNr; la flecha verde representa la acción reguladora de la dopamina secretada por la SNc (Lanciego et al. 2012).

1.3 Los Canabinoides y el sistema endocanabinoide.

Los canabinoides son compuestos extraídos de la planta *Cannabis Sativa* mejor conocida como marihuana, en la actualidad es una de las drogas ilegales más consumidas en el mundo (Di Marzo 2004). El principal compuesto que presenta la mayor actividad psicoactiva es el Δ^9 -tetrahidrocannabinol, el cual genera sus

efectos a través de receptores que se encuentran en la membrana celular, principalmente en neuronas del sistema nervioso central (Basavarajappa 2017). Se sabe que las neuronas del SNC y otras células del cuerpo, pueden sintetizar cannabinoides llamados endocannabinoides y que estos están jugando un papel muy importante en la fisiología celular.

El término "endocanabinoide" fue acuñado en la década de 1990 después del descubrimiento de receptores de membrana para el Δ^9 -tetrahidrocannabinol y sus ligandos endógenos. El sistema endocanabinoide (SEC), es un sistema complejo de señalización que comprende receptores para cannabinoides, ligandos endógenos y enzimas para la biosíntesis e inactivación de éstos ligandos (Di Marzo et al. 2004). Se sabe que el SEC está implicado en varias funciones fisiológicas y patológicas, tanto en el sistema nervioso central y periférico, como en los órganos periféricos. Se ha observado que la modulación de la actividad del SEC resulta prometedora para el tratamiento de una amplia gama de enfermedades y condiciones patológicas, por ejemplo, en el SNC con los trastornos del movimiento como el Parkinson y la enfermedad de Huntington, el dolor neuropático, la esclerosis múltiple y lesiones en la médula espinal (Pacher et al. 2006). Se conocen actualmente dos principales receptores del SEC, el receptor canabinoide tipo 1 y tipo 2 (CB1 y CB2, respectivamente), los cuales son activados principalmente por dos ligandos endógenos, el N- araquidonoiletanolamina también conocida como anandamida (AEA) y el 2-araquidonoilglicerol (2-AG), estos dos compuestos son lípidos que se sintetizan a partir de precursores de fosfolípidos de membrana (Fig. 3). Por otra parte, se ha propuesto la existencia de otros receptores que tienen alguna afinidad a los cannabinoides ya sean sintéticos o endógenos por lo que se han clasificado como receptores a cannabinoides No CB1/No CB2 (Balenga et al. 2011).

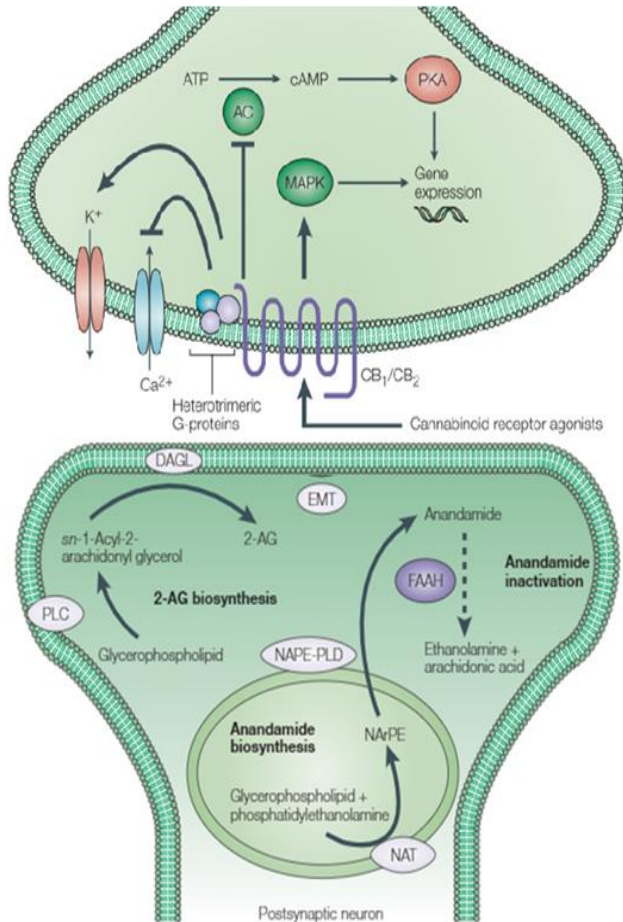


Figura 3: Resumen esquemático del sistema endocanabinoide. El 2-AG se sintetiza a partir de glicerofosfolípidos por la enzima fosfolipasa C (PLC) y la diacilglicerol lipasa (DAGL). La anandamida se sintetiza a partir glicerofosfolípidos y fosfatidiletanolamina por las enzimas N-acetiltransferasa (NAT) y N-acilfosfatidiletanolaminafosfolipasa D-específica (NAPE-PLD). En la hendidura sináptica los endocanabinoides activan a receptores CB1 y CB2 que están acoplados a una proteína G α_i . La subunidad α inhibe la adenilil ciclasa y la activación de PKA. El complejo $\beta\gamma$ inhibe los canales de calcio tipo N y P/Q y estimula los canales de potasio tipo GIRK (Modificada de Marzo 2004).

1.3.1 Receptor CB1

El receptor CB1 pertenece a la familia de los receptores acoplados a proteínas G, se encuentra abundantemente en el SNC pero también está distribuido, en menor medida, en otros tejidos. En el SNC la mayor densidad de receptores CB1 se encuentra en el cerebelo, en la sustancia *nigra pars reticulata*, el globo pálido y el hipocampo (Fig. 4) (Katona et al. 2009). En la sinapsis, los endocanabinoides se liberan retrógradamente a la hendidura sináptica activando receptores CB1 (Sierra et al. 2015), el cual está acoplado a una proteína G $\alpha_{i/o}$, inhibiendo la liberación de neurotransmisores (Marcu et al. 2013) (Fig. 1). La sub-unidad α de la proteína Gi

inhibe la AC, mientras que el complejo $\beta\gamma$ activa a canales de potasio tipo GIRK e inhiben los canales de calcio (Basavarajappa et al. 2017). Recientemente en el SNC se ha observado la presencia del receptor CB2, el cual es más abundante en tejidos periféricos.

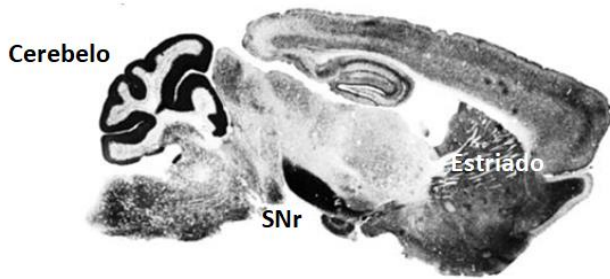


Figura 4: Distribución de CB1 en el cerebro de rata. Imagen que muestra la distribución del receptor CB1 tras colocar anticuerpo específico contra este receptor en un ensayo de inmunohistoquímica en cerebro de rata (Katona et al. 2009).

1.3.2 Receptor CB2

El receptor CB2 es miembro de la familia de proteínas GPCR y estructuralmente está compuesto por siete hélices α transmembranales. Los receptores CB2 y CB1 tienen 44% de homología de aminoácidos a nivel transmembranal (Malfitano et al. 2014). El receptor CB2 a diferencia del CB1, se encuentra expresado principalmente en tejidos periféricos; sin embargo, se ha observado la expresión de CB2 en el GPe, GPi y en la SNr (Sierra et al. 2015). Experimentos de inmunohistoquímica en rebanadas de núcleo subtalámico de rata, muestran que el receptor CB2 co-localiza con células marcadas con el transportador vesicular de glutamato (vGLUT2), que es un marcador para células glutamatérgicas, (Sánchez-Zavaleta et al. 2018). Con respecto a su funcionalidad, CB2 se acopla a una proteína $G\alpha_i$ al igual que CB1, evidencia de esto son los experimentos de liberación de glutamato en rebanadas de la SNr realizados por Sánchez-Zavaleta y colaboradores en el 2018, donde se observó la inhibición de la liberación de glutamato al colocar GW833972A (un agonista selectivo a CB2), este efecto fue prevenido al colocar AM630 el cual es un antagonista CB2 (Fig. 5). Además de los receptores a cannabinoides clásicos CB1 y CB2, recientemente se han caracterizado otros receptores que son modulados por endocannabinoides pero con

ciertas características diferentes, como es el acople a otras proteínas que no sean $G\alpha_i$, este es el caso del receptor GPR55.

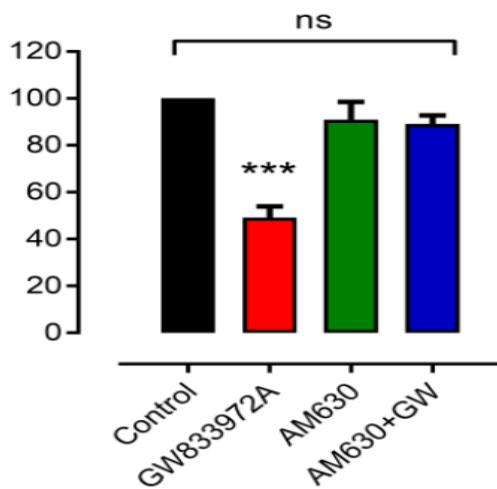


Figura 5. Efecto de la activación del receptor CB2.

Experimento de liberación de glutamato en rebanadas de la SNr. Se observa la disminución de la liberación de glutamato al colocar GW833972A (barra roja), con respecto del control (barra negra). Al colocar AM630 el efecto de GW833972A se ve prevenido (barra azul) (Sánchez-Zavaleta et al. 2018).

1.3.3 Receptor GPR55

El receptor GPR55 fue clonado en 1999, el cual presenta siete dominios transmembranales (7TM) (Sawzdargo et al. 1999). El gen humano del receptor GPR55 se mapeó en el cromosoma 2q37, que codifica 319 aminoácidos de longitud y comparte 67% de los aminoácidos con su homólogo de rata y 13.5% y 14.4% de homología con receptores cannabinoides CB1 y CB2 respectivamente (Balenga et al. 2011). Este receptor se propuso inicialmente como un receptor para cannabinoides tipo 3 (CB3) por ser activado por endocannabinoides, fitocannabinoides y cannabinoides sintéticos que actúan como agonistas o antagonistas del receptor, sin embargo, la farmacología y la señalización del receptor GPR55 son bastante distintas en comparación con los receptores de cannabinoides clásicos (Piñeiro et al. 2012).

Se ha propuesto al L- α -lisofosfatidilinositol (LPI) como un agonista endógeno para el receptor GPR55 (Oka et al. 2007), éste compuesto es un lisofosfolípido (LPS) producto de la enzima fosfolipasa A (PLA). Esta enzima pertenece a una familia de esterasas que hidrolizan ésteres de ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana (PL) (Piñeiro et al. 2012). Recientemente se ha descrito que el LPI es

exportado al espacio extracelular gracias a transportadores de membrana dependiente de ATP (ABCC1). El LPI promueve la fosforilación de ERK y aumenta los niveles de Ca^{2+} intracelular (Yamashita et al. 2013). Se sabe que la activación de GPR55 por parte del LPI modula diferentes vías de señalización.

Durante la última década, en sistemas de transfección se ha observado que el receptor GPR55 no se acopla a una proteína $\text{G}\alpha_s$ y parece no modular la actividad de la adenilil ciclasa. Por otra parte la activación de GPR55 induce la liberación de calcio intracelular a través de $\text{G}\alpha_{13}/\text{RhoA}$ (Martinez-Pinilla et al. 2014), $\text{G}\alpha_q/\text{PLC}$ y por $\text{G}\alpha_{12}/\text{RhoA}$ (Lauckner et al. 2008). También se ha encontrado que GPR55 modula la fosforilación de ERK (Oka et al. 2007) (Fig. 6).

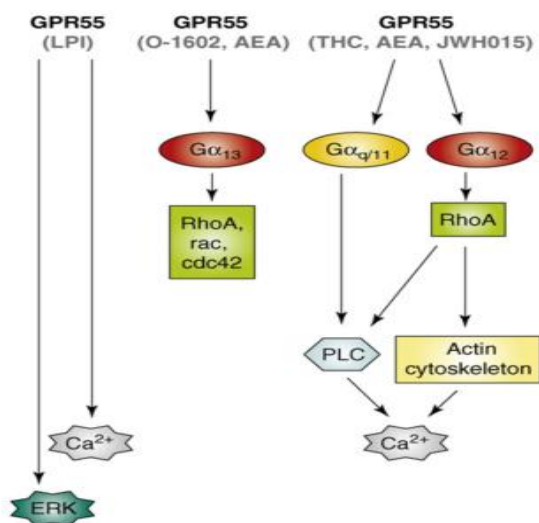


Figura 6. Vías de señalización de GPR55. Imagen donde observamos la activación de las vías de $\text{G}\alpha_{13}/\text{RhoA}$, $\text{G}\alpha_q/\text{PLC}$ y $\text{G}\alpha_{12}/\text{RhoA}$ y la liberación de Ca^{2+} al estimular el receptor GPR55 (Ross et al. 2009).

El receptor GPR55 se distribuye en varios tejidos, en el SNC se localiza predominantemente en la corteza frontal y el cuerpo estriado, aunque también se observa en hipotálamo, tronco encefálico, hipocampo, cerebelo y médula espinal (Ryberg et al. 2007). En nuestro grupo de trabajo se observó que GPR55 co-localiza con cuerpos celulares positivos a sustancia P, el cual es un marcador de la vía directa de los ganglios basales e interesantemente la lesión del estriado con ácido kaínico provoca la disminución de la expresión de GPR55 en aferencias a la SNr, lo cual sugiere que GPR55 se encuentra expresado en la vía estriato-nigral.

Por otra parte, en células de la SNc marcadas con tirosina hidroxilasa (TH) hay una co-localización del ARN mensajero para GPR55, lo que sugiere que también puede estar presente en la SNc (Celorrio et al. 2017) (Fig. 7).

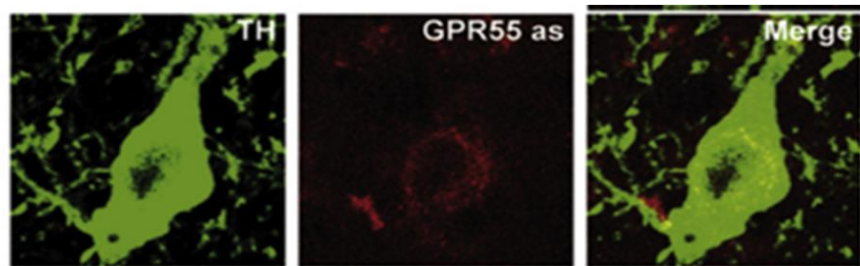


Figura 7: GPR55 se expresa en células de la SNc. Co-localización de células positivas a TH con el mensajero del receptor GPR55 en células de la SNc. En verde se representa la marca de TH y en rojo el mensajero del receptor GPR55 (Celorrio et al. 2017).

Por otra parte, en nuestro grupo de trabajo se observó que en terminales estriato-nigrales al colocar LPI hay un aumento de la liberación de GABA y este se previene al administrar CID 160246, un antagonista selectivo para el receptor GPR55 (Fig. 8) (Sanchez-Zavaleta, tesis de doctorado, 2018).

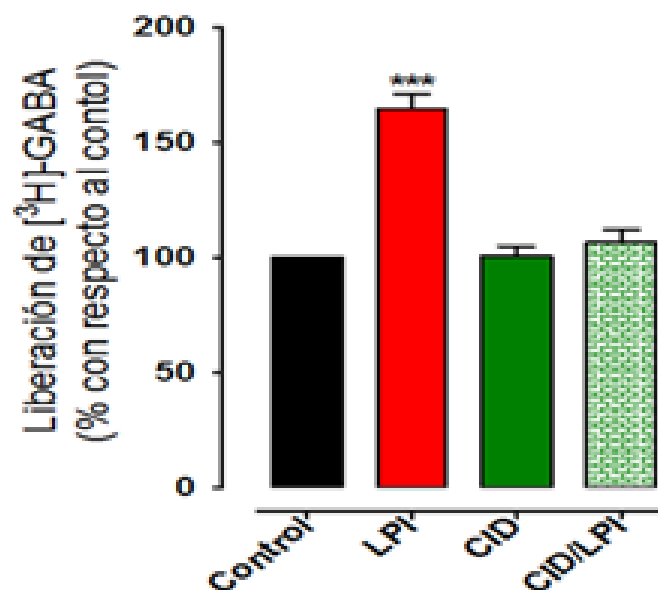


Figura 8: GPR55 estimula la liberación de GABA en terminales estriato-nigrales. Gráfica donde se muestra la regulación de GABA por parte de GPR55, donde LPI promueve un aumento en la liberación de GABA y el antagonista selectivo de GPR55 el CID 16020046 previene el efecto del LPI (Sánchez-Zavaleta R, 2018. Tesis de Doctorado).

Se ha encontrado que la estimulación con GPR55 aumenta el calcio intracelular, Oka y colaboradores en 2009 mostraron en sistemas de expresión heteróloga, al colocar LPI aumenta la liberación de calcio a partir de los compartimentos intracelulares. Por otra parte, en la región CA1 del hipocampo el LPI favorece la probabilidad de liberación de glutamato, efecto que se previene con la tapsigargina y la rianodina, lo cual sugiere que GPR55 promueve la liberación de neurotransmisores involucrando el aumento de calcio de compartimentos intracelulares (Sylantsev et al. 2013).

Nuestro grupo de trabajo encontró que al depletar el calcio de los compartimentos intracelulares con tapsigargina en rebanadas de la SNr, el efecto estimulador de LPI no se previene y al bloquear la PKA con H-89 el efecto estimulador de LPI sobre la liberación de GABA se previene, lo que sugiere que la vía de señalización de GPR55 depende de AC-AMPC-PKA y no del calcio de los compartimentos intracelulares. Sin embargo, Obara y colaboradores en 2011 observaron que al activar a GPR55 con los agonistas LPI, anandamida, 2-AG y CP no había un aumento de los niveles de AMPC en sistemas de transfección (Fig. 9). Esta discrepancia entre los efectos de la activación de receptores GPR55 y la formación de AMPC, podría estar relacionada con la activación de receptores D1 que se encuentran en las terminales estriato-nigrales.

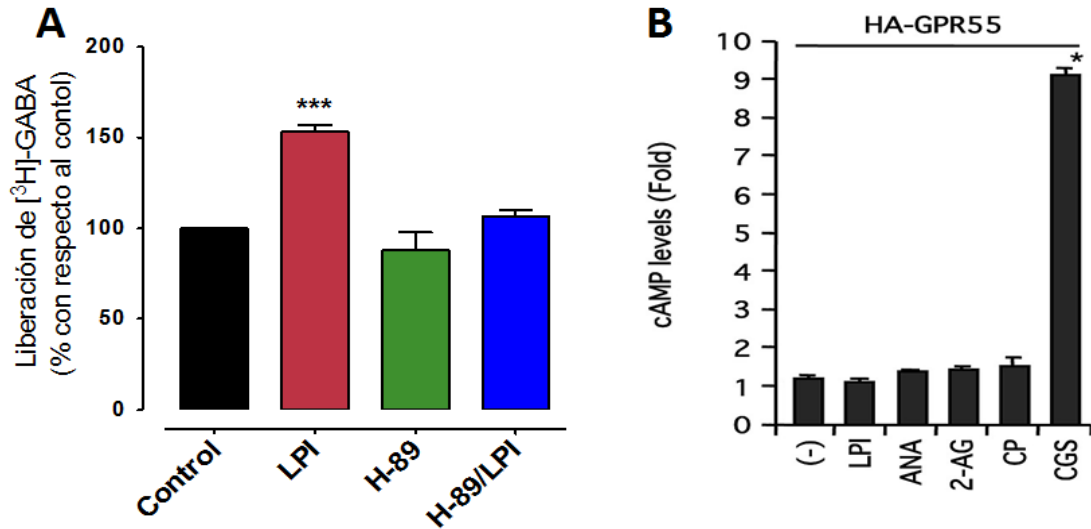


Figura 9: Modulación de GPR55 sobre la vía AC-AMPC-PKA. (A) Gráfica donde se observa la liberación de GABA estimulada por LPI (agonista GPR55) y la prevención de su efecto con el inhibidor de la PKA (H-89) (Sánchez-Zavaleta, 2018., Tesis de Doctorado). (B) Gráfica que muestra los niveles de AMPc tras colocar agonistas de GPR55 como LPI, anandamida, 2-AG y CP se observa que no aumentan los niveles de AMPc. Como control positivo se muestra la activación de receptores A₂A que aumentan la formación de AMPc por su acople a proteínas Gα_s (Obara, et al., 2011).

1.4 Receptores para dopamina D1 y su acople a la vía AC-AMPC-PKA por medio de una proteína Gα_{olf}.

Los receptores para dopamina pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G. El receptor D1 estimula la actividad de adenilil ciclasa a través de subtipos de proteínas Gα_s o Gα_{olf}. Los receptores D1 se expresan abundantemente en el núcleo estriado y preferentemente, en una subpoblación de neuronas GABAérgicas que se proyectan hacia el núcleo entopeduncular y la SNr (Jan et al. 2007). Se ha observado mediante hibridación *in situ* a los mensajeros de las proteínas Gα_{olf} y Gα_s. Gα_{olf} está altamente expresado en el estriado. Por el contrario, la expresión de Gα_s es apenas detectable en este núcleo. Se ha observado que al activar al receptor D1 con SKF 81297 y cocaína (que aumenta la concentración extracelular de dopamina al bloquear su recaptura actuando como un agonista indirecto de los receptores D1), hay un aumento de la actividad

motora, éste efecto se previene en ratones Knock-out para la proteína $G\alpha_{olf}$, lo que sugiere que $G\alpha_{olf}$ está presente en el núcleo estriado y es regulada por receptores D1 (Fig. 10) (Zhuang et al. 2000). Por otra parte, se sabe que $G\alpha_{olf}$ en células del núcleo estriado estimula principalmente a la AC V favoreciendo la formación de AMPc y la estimulación de la PKA (Hervé 2011).

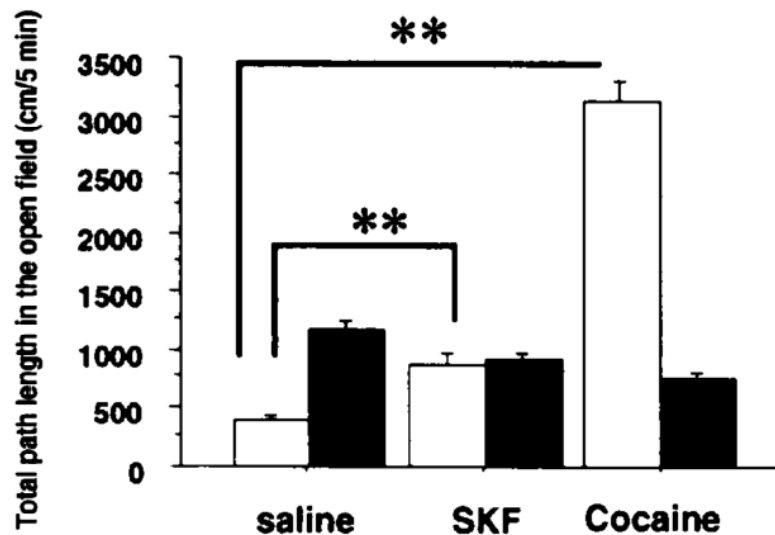


Figura 10. El receptor D1 se acopla a una proteína $G\alpha_{olf}$ en núcleo estriado. Registro de la actividad motora por medio de la medición de la longitud del trayecto realizado por ratas wild type (barras blancas) y en ratas knockout para proteína $G\alpha_{olf}$ (barras negras). Se administró SKF 81297 un agonista de receptor D1 y cocaína un agonista indirecto del receptor D1 (Zhuang et al. 2000).

Nuestro grupo de trabajo observó en rebanadas de la SNr, que al generar un pulso despolarizante con alto potasio en experimentos de liberación, hay un aumento de la liberación de dopamina endógena que se encuentra en dendritas de la SNc y está activa a los receptores de D1, que se encuentran en las terminales estriato-nigrales favoreciendo la liberación de GABA. Este efecto se previene por SCH23390 antagonista selectivo de receptores D1.

2 Planteamiento del problema.

El receptor GPR55 es un receptor a cannabinoides atípico que se expresa en varios núcleos del SNC (Ryberg et al., 2007), en nuestro grupo de trabajo hemos observado que el receptor GPR55 se expresa en la vía estriato-nigral y tras su activación con el agonista LPI promueve la liberación de GABA. Una evidencia reciente sugiere la presencia del receptor GPR55 en neuronas de la SNc (Celorrio et al. 2017), lo cual nos lleva a la pregunta si la liberación de GABA estimulada por el LPI en la SNr está mediada por la activación de receptores GPR55 de las dendritas provenientes de la SNc, lo cual favorecería la liberación de dopamina a la hendidura sináptica y en consecuencia promovería la activación de los receptores D1 en la terminal estriato-nigral y la liberación de GABA (Fig. 11). Por otra parte, la vía de señalización de GPR55 involucra un acople a una proteína $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$ o $G\alpha_{13}$, con el consecuente aumento de los niveles de calcio citoplasmático a partir de compartimentos intracelulares, sin embargo, hemos observado que en rebanadas de la SNr, la liberación de GABA estimulada por el receptor GPR55 no depende del calcio de compartimentos intracelulares y además este aumento de la liberación de GABA se previene con el inhibidor de la PKA (H-89), por tal motivo es importante determinar si éste efecto depende de un probable acople a una proteína $G\alpha_{olf}$ y la vía AC-AMPC-PKA directamente en la terminal estriato-nigral (Fig. 12).

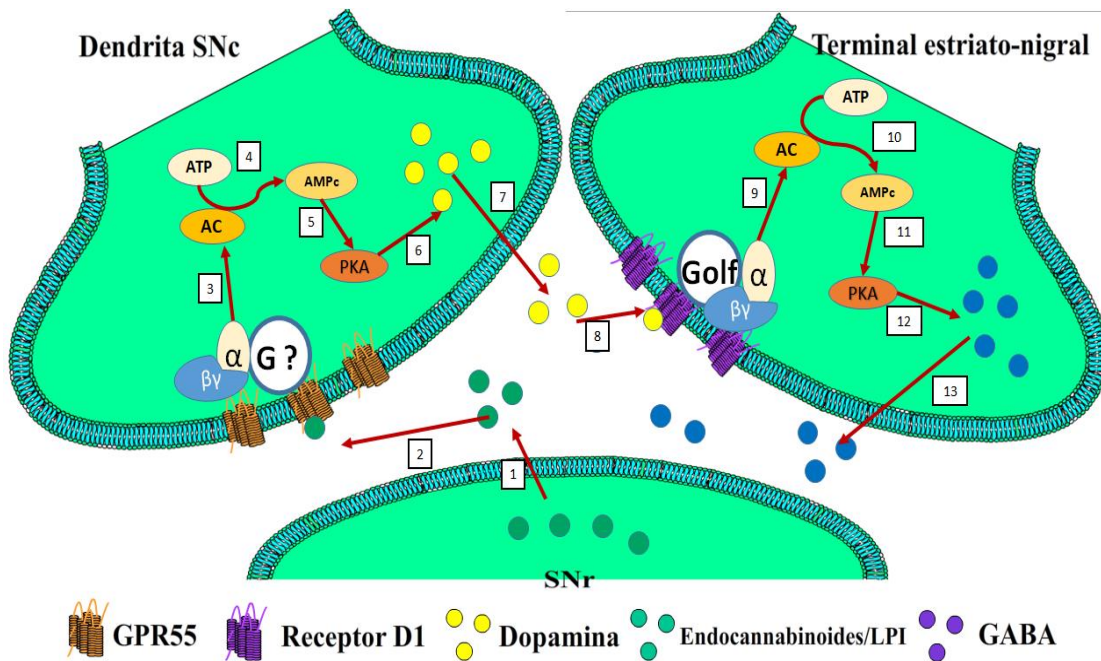


Figura 11. Planteamiento del problema: La liberación de GABA estimulada por el receptor GPR55 en las terminales estriato-nigrales pudiera darse de manera indirecta. 1) Liberación de endocannabinoides de la SNr. 2) Endocannabinoides o LPI exógeno activan receptores GPR55 que se encuentran en dendritas de la SNc activando alguna proteína G. 3) La sub-unidad α activa la AC. 4) Aumento del AMPc por la actividad de la AC. 5) El AMPc activa a PKA. 6) y 7) PKA favorece la liberación de dopamina a la hendidura sináptica. 8) La dopamina activa receptores D1 en la terminal estriato nigral. 9) La sub-unidad α de la proteína Golf activa la AC. 10) Aumento del AMPc por la actividad de la AC. 11) El AMPc activa a PKA. 12) y 13) PKA favorece la liberación de GABA a la hendidura sináptica.

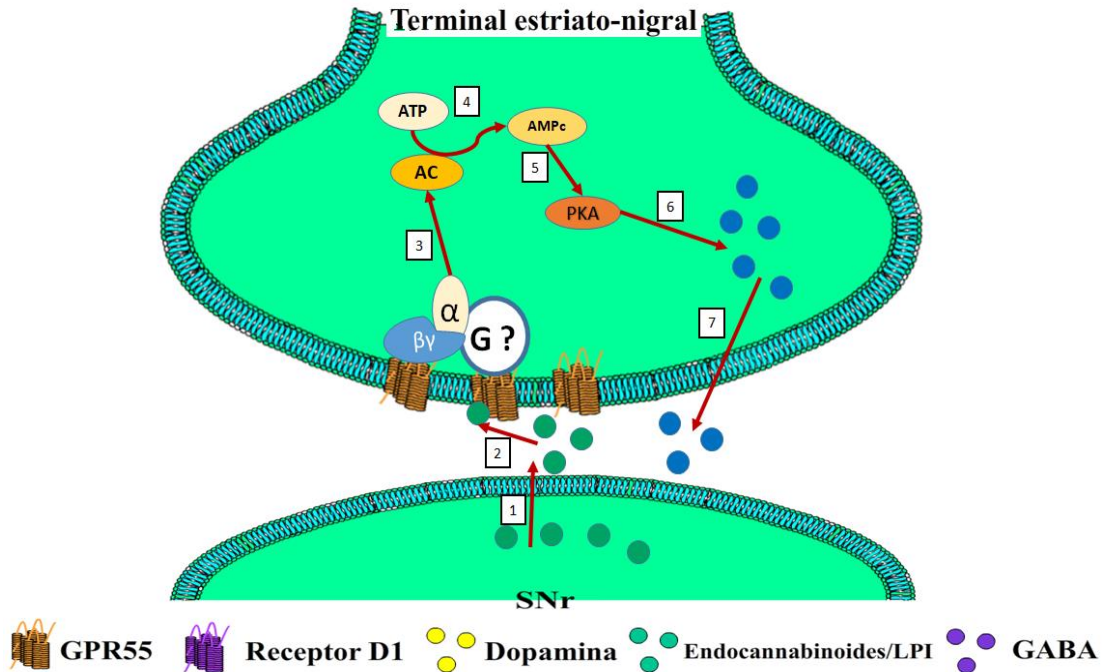


Figura 12. Planteamiento del problema: La liberación de GABA estimulada por el receptor GPR55 en las terminales estriato-nigrales pudiera darse de manera directa. 1) Liberación de endocannabinoides de la SNr. 2) Endocannabinoides o LPI exógeno activan receptores GPR55 que se encuentran en las terminales estriato-nigrales activando alguna proteína G. 3) La sub-unidad α activa la AC. 4) Aumento del AMPc por la actividad de la AC. 5) El AMPc activa a PKA. 6) y 7) PKA favorece la liberación de GABA a la hendidura sináptica.

3 Hipótesis.

La liberación de GABA en las terminales estriato-nigrales estimulada por el receptor GPR55 depende de la activación de receptores D1 y de una enzima adenilil ciclasa.

4 Objetivo general.

- Determinar el papel de la dopamina endógena, los receptores D1 y la adenilil ciclasa sobre la liberación de GABA estimulada por receptores GPR55 en la vía estriato-nigral.

4.1 Objetivos particulares.

- Estudiar el efecto de la depleción dopaminérgica sobre la estimulación de la liberación de GABA por activación de receptores GPR55.
- Estudiar el efecto del bloqueo de receptores D1 sobre la estimulación de la liberación de GABA mediada por receptores GPR55.
- Estudiar el efecto del bloqueo de la adenilil ciclasa V sobre la liberación de GABA mediada por GPR55 en ratas reserpinizadas.

5 Material y métodos.

5.1 Obtención de la sustancia *nigra pars reticulata* (SNr).

Los núcleos de SNr se obtuvieron de ratas Wistar machos que se mantuvieron y manipularon de acuerdo con las normas del Comité de Cuidados Animales del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Después de la decapitación rápida, el cerebro fue removido y sumergido en líquido cerebroespinal artificial o Krebs-Henseleit, con la siguiente composición: 118,25 mM NaCl, 1,75 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 1,25 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 2 mM CaCl₂ y 10 mM D-glucosa, gaseado continuamente con O₂ / CO₂ [95: 5] a 4 ° C, pH 7.4. El cerebro se colocó en un cubo de metal en una placa de Petri llena con Krebs-Henseleit a 4°C se realizaron cortes coronales de 300µm para obtener la SNr. Las rebanadas obtenidas se colocaron en Krebs-Henseleit a 4°C. (González et al. 2009).

5.2 Depleción de la dopamina endógena con reserpina.

Varios grupos experimentales del proyecto fueron tratados previamente con reserpina (10 mg/kg) 18 h antes de la obtención de las rebanadas de la SNr. Este tratamiento causa una caída de más del 92% en el contenido de dopamina en la sustancia nigra (García et al. 1997).

5.3 Fármacos utilizados.

Los fármacos utilizados se obtuvieron de Sigma-Aldrich y se diluyeron en DMSO o agua destilada según las indicaciones del proveedor para cada fármaco. El agonista selectivo para GPR55, L- α -lisofosfatidilinositol (LPI), se utilizó a una concentración de 100nM en todos los experimentos de liberación; CID 16020046 que es el antagonista selectivo para GPR55 se utilizó a una concentración de

400nM; NKY 80 inhibidor selectivo de la AC V se utilizó a concentraciones de 10µM. Para inhibir la actividad de la sub-unidad βγ se utilizó Galeina a 10µM; SCH 23390 se usó como antagonista de los receptores D1 a una concentración de 100nM; Gö 6983 un inhibidor de la PKC se usó a 10µM; ARA-A ó Vidaravine se ha caracterizado como un inhibidor a AC V pero a diferentes concentraciones puede bloquear otras adenilil ciclasas, se utilizó a una concentración de 230µM que es la concentración referida para bloquear la AC VII.

5.4 Liberación de [³H] GABA.

El tejido obtenido se incubó durante 30 min a 37 ° C en Krebs-Henseleit. Posteriormente, se transfirieron durante 30 minutos a Krebs-Henseleit que contenía [³H] GABA 8nM en 2ml de solución de Krebs-Henseleit que contenía ácido aminooxiacético 10µM (para evitar, mediante la inhibición de la transaminasa GABA, la degradación del GABA). Al final de este período, se eliminó el exceso del marcador radiactivo realizando lavados en tres tiempos con Krebs-Henseleit que contiene, además del ácido aminooxiacético, ácido nipecótico, el cual es un inhibidor del transportador de GABA (GAT), lo que evita la captura del neurotransmisor por parte de la célula. Ambos compuestos estuvieron presentes en la solución de perfusión durante el resto del experimento. El tejido se repartió aleatoriamente en un sistema de perfusión que presenta 20 cámaras en paralelo con un volumen de 80µl para cada cámara (estas cámaras pueden conectarse a las condiciones y al medio deseado por el experimentador) y se perfundió con el medio a una velocidad de 0,5 ml/min. La liberación basal de [³H] GABA se midió recolectando cuatro fracciones de lo perfundido en intervalos de 4 minutos (cada fracción de 2ml), posteriormente se estimuló la liberación cambiando a una solución de Krebs-Henseleit con 15mM de K⁺ o alto potasio (NaCl 101.25mM, KCl 18.75mM, MgSO₄ 1mM, NaHCO₃ 4.25mM, KH₂PO₄ 1.25mM, CaCl₂ 2mM, y D-glucosa 10mM). Seis fracciones más fueron colectadas en condiciones de alto potasio. Para determinar la cantidad de GABA remanente en el tejido, se obtuvieron las rebanadas de las cámaras y se trataron con 1ml de

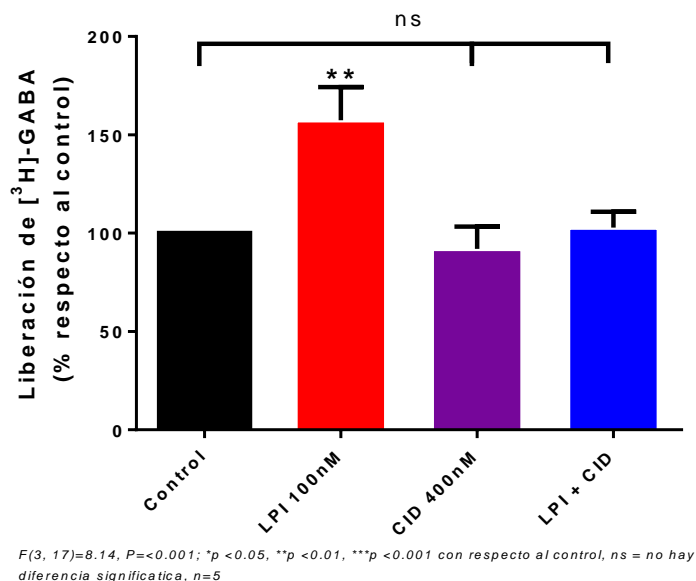
HCl 1N, se dejan reposar hasta el siguiente día antes de la adición del líquido de centelleo.

La liberación de [³H] GABA se expresó como una fracción del total de la cantidad de tritio restante en el tejido. El efecto de los fármacos utilizados sobre los cambios de la liberación de [³H] GABA se evaluó con el cociente de todas las fracciones entre la fracción cuatro y comparando las áreas bajo la curva de la liberación [³H] GABA de cada condición establecida (Florán et al. 2004).

6 Resultados.

6.1 La dopamina endógena no está implicada en la liberación de GABA estimulada por la activación del receptor GPR55.

Los resultados obtenidos de los experimentos de liberación (Gráfica 1), muestran que, tras depletar la dopamina endógena con reserpina, no se modifican los efectos del receptor GPR55 sobre la liberación de GABA, observando los mismos resultados de Sánchez-Zavaleta en el 2018, en experimentos de liberación en rebanadas de la SNr, donde no se depletó la dopamina endógena (liberación de GABA respecto del control: LPI=157.5±14.3%, diferencia promedio=-57.4, $p < 0.001$, $F = 8.14$, $df = 17$). Esto nos sugiere que la dopamina endógena no está implicada en la liberación de GABA generada por la activación del receptor GPR55 en las terminales estriato-nigrales.



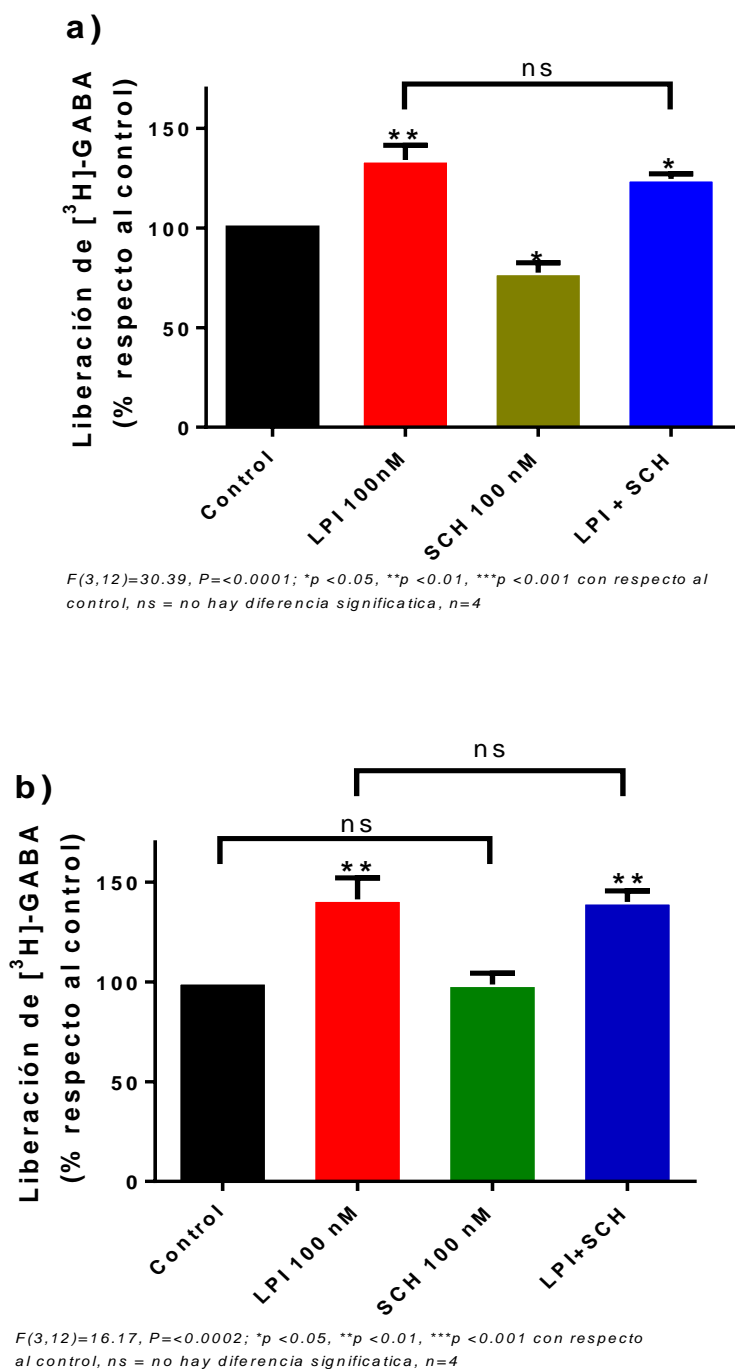
Gráfica 1. Efecto de la depleción dopaminérgica sobre la liberación de GABA por activación de receptores GPR55. Se muestra el efecto del receptor GPR55 al ser activado por LPI el cual promueve la liberación de GABA (barra roja), este efecto se ve prevenido al colocar CID 16020046

antagonista selectivo de GPR55 (barra azul), el CID 16020046 por sí solo no presenta diferencia significativa respecto al control y al LPI+CID (barra verde), todo esto en rebanadas de SNr de ratas reserpinizadas ($F(3,17)=8.14$, $P=<0.001$; $*p <0.05$, $**p <0.01$, $***p <0.001$ con respecto al control, *ns* = no hay diferencia significativa entre los grupos, ANOVA de una vía por prueba de comparación múltiple de Tukey, $n=5$).

6.2 El bloqueo de los receptores D1 no modifica la liberación de GABA por la activación del receptor GPR55.

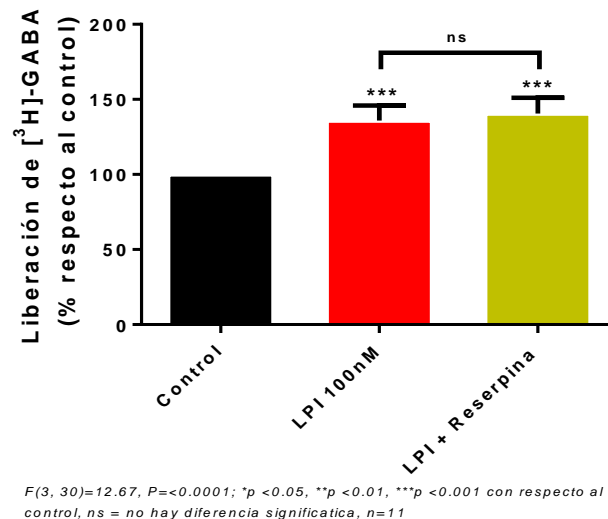
Posteriormente se observó si los receptores D1 pudieran estar implicados en la liberación de GABA mediada por los receptores GPR55. En experimentos de liberación en rebanadas de SNr tanto en ratas reserpinizadas, como no reserpinizadas se adicionó el antagonista del receptor D1, SCH 23390, observando que la liberación de GABA estimulada por el receptor GPR55 no se ve modificada y que el bloqueo del receptor D1 no previene los efectos del LPI como podemos observar en la gráfica 2a y 2b (gráfica a. liberación de GABA respecto del control: LPI=134.1±6.5%, diferencia promedio=-34.1, $p<0.0001$, $F=30.39$, $df=12$; LPI=134.1±6.5% vs. LPI+SCH 23390=124.6±6.5%, diferencia promedio=9.58, $p<0.0001$, $F=30.39$, $df=12$, ANOVA post Tukey, $n=4$ experimentos; gráfica b. liberación de GABA respecto del control: LPI=141.4±8.7%, diferencia promedio=-41.36, $p<0.0002$, $F=16.17$, $df=11$; LPI=141.4±8.7% vs. LPI+SCH 23390=140±8.7%, diferencia promedio=1.3, $p<0.0002$, $F=12.94$, $df=12$, ANOVA post Tukey, $n=4$ experimentos), también tras colocar solamente SCH 23390, disminuye la liberación de GABA con respecto al control similar a lo observado por nuestro grupo de trabajo anteriormente (gráfica a. liberación de GABA respecto del control: SCH 23390=77.5±6.5%, diferencia promedio=22.41, $p<0.0001$, $F=30.39$, $df=12$). También se analizó todos los experimentos que se realizaron con LPI y reserpina comparándolos con los experimentos de LPI sin reserpina (Gráfica 3), observando que no hay una diferencia significativa entre ambas condiciones (liberación de GABA con respecto del control: LPI sin reserpina 135.9±8.8% vs. LPI con reserpina 140.7±8.8%, diferencia promedio=-4.7, $p<0.0001$, $F=12.67$, $df=30$, ANOVA post Tukey, $n=4$

experimentos), lo que sugiere que el receptor D1 y la dopamina endógena no están participando en la liberación de GABA estimulada por el receptor GPR55.



Gráfica 2. Efecto del bloqueo de receptores D1 sobre la estimulación de la liberación de GABA mediada por los receptores GPR55 en ratas reserpinizadas y no reserpinizadas. a) SCH 23390 no previene la liberación de GABA producida por el LPI como se muestra en la barra

azul donde no hay diferencia significativa con respecto al LPI (barra roja), también se observa que el SCH 23390, por sí solo disminuye la liberación de GABA (barra verde) con respecto del control (barra negra). La barra roja muestra la liberación de GABA por parte del LPI mostrando una diferencia significativa con el control y con el SCH 23390 ($F(3,12)=30.39$, $P<0.0001$; * $p <0.05$, ** $p <0.01$, *** $p <0.001$ con respecto al control, ns = no hay diferencia significativa entre los grupos, ANOVA de una vía por prueba de comparación múltiple de Tukey, $n=4$). **b)** Mismo experimento realizado como un control del inciso a) en ratas reserpinizadas donde se observan resultados similares, sin embargo el efecto del SCH 23390 no se observa ($F(3,12)=16.17$, $P<0.0002$; * $p <0.05$, ** $p <0.01$, *** $p <0.001$ con respecto al control, ns = no hay diferencia significativa entre los grupos, ANOVA de una vía por prueba de comparación múltiple de Tukey, $n=4$).

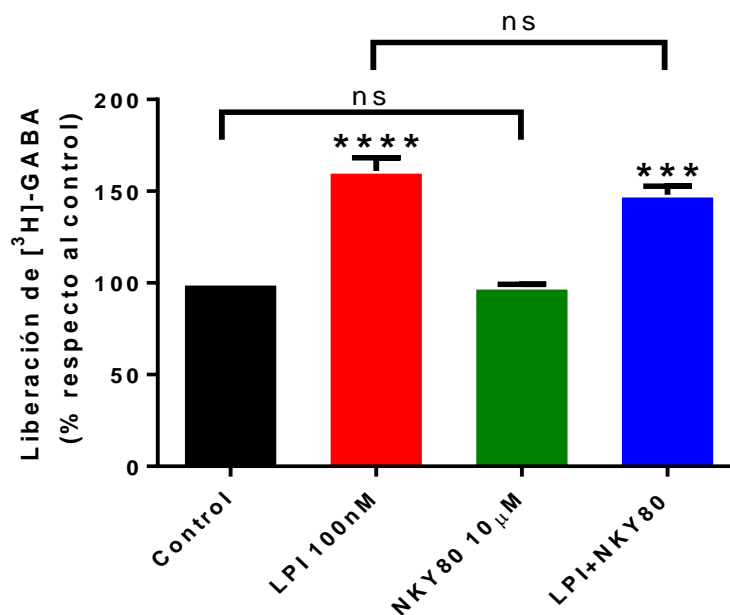


Gráfica 3. Efecto de la reserpina sobre la liberación de GABA mediada por el receptor GPR55. El LPI por sí solo (barra roja) no presenta una diferencia significativa con respecto al LPI que se colocó en rebanadas de SNr tratadas previamente con reserpina (barra verde), ambos si presentan diferencia significativa con respecto al control (barra negra) ($F(3,30)=12.67$, $P<0.0001$; * $p <0.05$, ** $p <0.01$, *** $p <0.001$ con respecto al control, ns = no hay diferencia significativa entre los grupos, ANOVA de una vía por prueba de comparación múltiple de Tukey, $n=11$).

6.3 La adenilil ciclasa V no está implicada en la liberación de GABA por la activación del receptor GPR55 en ratas reserpinizadas.

Como ya se mencionó, una probable vía de señalización del receptor GPR55 en la terminal estriato-nigral que puede explicar la liberación de GABA es la vía AC-AMPC-PKA, por lo que se exploró esta vía mediante el bloqueo de la AC V la cual es la AC que más se presenta en las terminales estriato-nigrales. Para demostrar

la implicación de la AC V en la liberación de GABA por el receptor GPR55, se utilizó NKY 80 que es su bloqueador específico a una concentración de 7.7 μ M (Brand et al. 2013). Se observó, en experimentos de liberación, que NKY 80 a una concentración de 10 μ M no previene la liberación de GABA estimulada por LPI (gráfica 4. liberación de GABA con respecto del control: LPI=161 \pm 6.1% vs LPI+NKY 80=148 \pm 6.1%, diferencia promedio=13.04, $p < 0.0001$, $F = 55.52$, $df = 8$, ANOVA post Tukey, $n = 3$ experimentos), lo que muestra que GPR55 no está regulando la liberación de GABA por medio de la vía de la AC V. Lo anterior nos llevó a preguntarnos qué otra vía podría estar modulando el receptor GPR55 que implicase a la PKA.

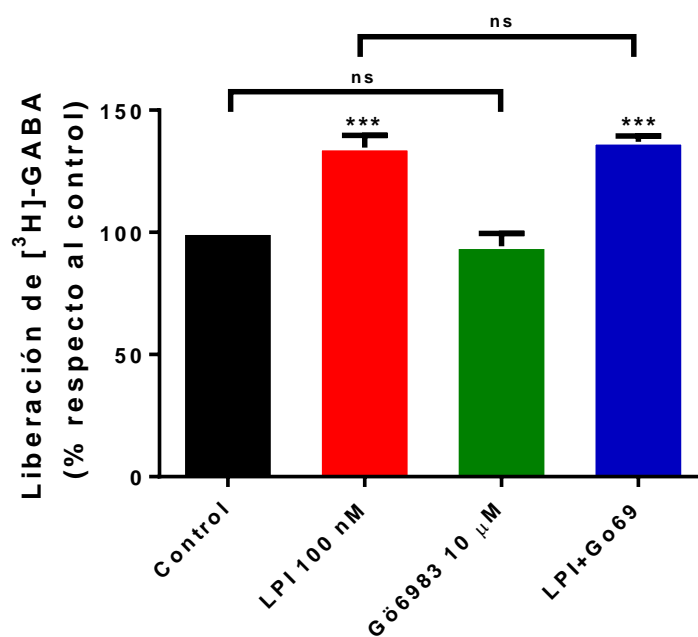


$F(3,8) = 55.52$, $P < 0.0001$; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ con respecto al control, ns = no hay diferencia significativa, $n = 3$

Gráfica 4. Efecto de la inhibición de la adenilil ciclasa V sobre la liberación de GABA mediada por el receptor GPR55 en ratas reserpinizadas. La barra en rojo muestra la mayor liberación de GABA por parte del LPI con respecto del control en negro, este efecto no se ve prevenido cuando se coloca NKY 80 en presencia de LPI, como se observa en la barra azul, el NKY 80 por sí solo (barra verde) no presenta efecto sobre la liberación GABA ($F(3,8) = 55.52$, $P < 0.0001$; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ con respecto al control, ns = no hay diferencia significativa entre los grupos, ANOVA de una vía por prueba de comparación múltiple de Tukey, $n = 3$).

6.4 La inhibición de PKC no previene la liberación de GABA por la activación del receptor GPR55.

Otra vía que pudiera estar implicada en la liberación de GABA estimulada por GPR55, es la activación de la PKC por la vía PLC-DAG-PKC, la cual es una vía activada por $G\alpha_q$, por lo que nos dimos a la tarea de investigar esta vía utilizando el fármaco Gö 6983, el cual es un inhibidor de la PKC. Observamos que Gö 6983 no previno el efecto del LPI manteniéndose la liberación de GABA como se muestra en la gráfica 5 (liberación de GABA con respecto del control: LPI=134±5.5% vs LPI+Gö 6983=137.8±5.5%, diferencia promedio=-2.3, $p<0.0001$, $F=30.56$, $df=11$, ANOVA post Tukey, $n=4$ experimentos), lo que sugiere que PKC no está implicada en la vía de activación de GPR55 en las terminales estriato-nigrales.



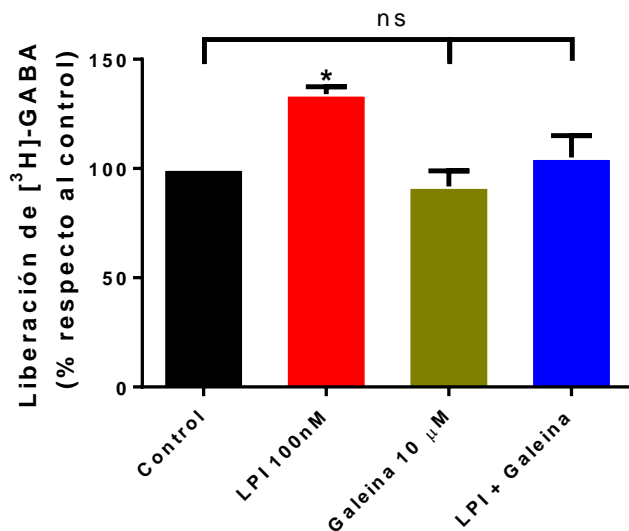
$F(3, 11)=30.56$, $P<0.0001$; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ con respecto al control, ns = no hay diferencia significativa, $n=4$

Gráfica 5. Efecto de la inhibición de la PKC en la liberación de GABA estimulada por GPR55.

Se administró 10 μ M de Gö 6983 en presencia de 100 nM de LPI en rebanadas de SNr (barra azul) sin diferencia significativa con las rebanadas tratadas solo con LPI (barra roja). Gö 6983 por sí solo (barra verde) no presentó diferencia con el control (barra negra) ($F(3,11)=30.56$, $P=<0.0001$; * $p <0.05$, ** $p <0.01$, *** $p <0.001$ con respecto al control, ns = no hay diferencia significativa entre los grupos, ANOVA de una vía por prueba de comparación múltiple de Tukey, $n=4$).

6.5 La inhibición de la sub-unidad $\beta\gamma$ previene la liberación de GABA por la activación del receptor GPR55.

Como se mencionó anteriormente la PKA está involucrada en la liberación de GABA estimulada por el receptor GPR55 en terminales estriato-nigrales. Sin embargo los resultados obtenidos anteriormente, muestran que la vía más probable que activa la PKA no está implicada. Otra vía alternativa que pudiera activar la PKA, es por medio de la activación de una adenilil ciclasa por la sub-unidad $\beta\gamma$ de una proteína G, por lo que realizamos experimentos de liberación en rebanadas de la SNr bloqueando la sub-unidad $\beta\gamma$ con galeina. Observamos que la galeina fue capaz de prevenir la liberación de GABA estimulada por el LPI (Gráfica 6; liberación de GABA con respecto del control: LPI=134 \pm 8.9% vs LPI+ Galeina=105.1 \pm 8.9%, diferencia promedio=28.95, $p<0.001$, $F=8.35$, $df=8$, ANOVA post Tukey, $n=3$ experimentos), lo que nos sugiere que la sub-unidad $\beta\gamma$ está implicada en la vía de señalización del receptor GPR55 y por ende en la liberación de GABA. Posteriormente nos dimos a la tarea de investigar la probable participación de la AC VII en la vía de señalización.

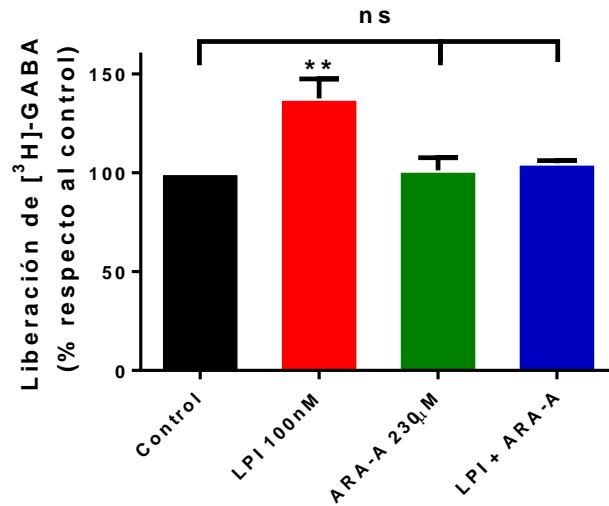


$F(3,8)=8.35, P<0.001$; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ con respecto al control, ns = no hay diferencia significativa, $n=3$

Gráfica 6. Efecto de la inhibición de la sub-unidad $\beta\gamma$ en la liberación de GABA mediada por GPR55. LPI (100nM) representado con la barra rojo presenta diferencia significativa con el control (barra negra), Galeina a 10 μ M (barra verde) y con galeina + LPI (barra azul) en rebanadas de la SNr. ($F(3,8)=8.35, P<0.001$; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ con respecto al control, ns = no hay diferencia significativa entre los grupos, ANOVA de una vía por prueba de comparación múltiple de Tukey, $n=3$).

6.6 Ara-A previene la liberación de GABA por la activación del receptor GPR55.

Ara-A también conocido como vidarabina, es un análogo de adenosina que se utilizaba en la clínica como un antiviral, principalmente contra Herpes virus. Brand et al. en sistemas de transfección mostraron que Ara-A puede inhibir las ACs a diferentes concentraciones para cada una. Ellos observaron que la inhibición para la AC VII se presentó a una concentración de 230 μ M, por lo que utilizamos ésta dosis para la realización de nuestros experimentos de liberación en rebanadas de la SNr. Como se observa en la gráfica 7, al colocar Ara-A en presencia de LPI se previene la liberación de GABA (liberación de GABA con respecto del control: LPI=137.7 \pm 8.9% vs LPI+ARA-A=104 \pm 8.3%, diferencia promedio=32.88, $p < 0.005$, $F=9.2$, $df=8$, ANOVA post Tukey, $n=3$ experimentos), sugiriendo la probable participación de la AC VII en la vía de señalización de GPR55.



*F(3,8)=9.24, P=<0.005; *p <0.05, **p <0.01, ***p <0.001 con respecto al control, ns = no hay diferencia significativa, n=3*

Gráfica 7. Efecto de ARA-A en la liberación de GABA mediada por GPR55. Rebanadas de SNr tratadas con Ara-A (230µM) más LPI (100nM) representado en barra azul presenta diferencia significativa con respecto a las rebanadas solo tratadas con LPI (barra roja). Ara-A por si solo (barra verde) no presente diferencia significativa con respecto del control y Ara-A más LPI. El LPI presenta diferencia significativa con todas las variables. ($F(3,8)=9.24, P=<0.005; *p <0.05, **p <0.01, ***p <0.001$ con respecto al control, *ns = no hay diferencia significativa entre los grupos, ANOVA de una vía por prueba de comparación múltiple de Tukey, n=3*).

7 Discusión.

Dado el hecho que Celorrio et al. en 2017 demostró la presencia del ARNm de GPR55 en la SNc, y por ende se estuviera expresando este receptor en dendritas de este núcleo que proyectan a la SNr, regulando la liberación de dopamina y así de manera indirecta la liberación de GABA en terminales estriato-nigrales, era importante descartar la participación de la dopamina para poder esclarecer el mecanismo por el cual el receptor GPR55 estuviese estimulando la liberación de GABA en las terminales estriato-nigrales. Nuestros resultados donde se realizó la depleción de dopamina endógena con reserpina y el bloqueo de receptores D1 con SCH 23390 en rebanadas de la SNr de ratas sin y con reserpina, demuestran que la dopamina que pudiera estar presente en las dendritas de la SNc y que proyecta a la SNr no está implicada en la liberación de GABA al activar el receptor

GPR55. Esto nos llevó a pensar que el efecto de la activación de GPR55 está directamente en la presinápsis de la terminal estriato-nigral. Cabe mencionar que el receptor GPR55 se encuentra presente en terminales estriato-nigrales como demostró Sánchez-Zavaleta en 2017.

Una vez descartada la participación de la dopamina endógena y los receptores D1 en el efecto del receptor GPR55, el siguiente paso fue determinar qué vía de señalización es la involucrada. Clásicamente, el receptor GPR55 se acopla a una proteína $G\alpha_{12/13}$ activando la vía de RhoA, favoreciendo la salida de Ca^{2+} de los compartimentos intracelulares (Martínez-Pinilla et al. 2014), sin embargo esto no sucede en la SNr como lo demostró nuestro grupo de trabajo en 2017 al depletar el calcio intracelular y observar que el efecto del LPI no se previene. Nuestro grupo de trabajo ha observado que al utilizar H-89 un inhibidor de la PKA, se previenen los efectos del receptor GPR55 en experimentos de liberación en rebanadas de la SNr, por lo que la vía de activación del receptor GPR55 pudiera implicar un aumento en el AMPc y la participación de las ACs. Por lo tanto, pensamos en la posible activación de la enzima AC V, la cual se expresa en el núcleo estriado (Glatt et. al. 1993 y Kim et al. 2006), por medio de una proteína $G\alpha_s$ que también está presente en el núcleo estriado (Zhuang et al. 2000), sin embargo Obara en el 2011 en sistemas de transfección donde sobreexpresa el receptor GPR55, demostró que el receptor GPR55 no se acopla a una proteína $G\alpha_s$.

Se tiene como antecedente que el receptor GPR55 puede acoplarse a otras proteínas G como es la $G\alpha_q$ (Ross et al., 2009) que activa la vía PLC-DAG-PKC. Además se sabe que el H-89, inhibidor de la PKA, puede inhibir también a la PKC a pesar de que el H-89 presenta una afinidad menor por la PKC que por la PKA (Naitoy et al., 1990), por lo que decidimos utilizar Gö 6983 un inhibidor de la PKC que no inhibe la PKA. Nuestros resultados mostraron que al inhibir la actividad de la PKC con Gö 6983 no se previene la liberación de GABA estimulada por el receptor GPR55, lo que sugiere que esta vía no está implicada en el mecanismo

por el cual actúa el receptor GPR55 en el efecto estimulador de la liberación de GABA. Posteriormente decidimos ver si la AC V estaba participando en el efecto estimulador del receptor GPR55. La inhibición de la AC V con NKY 80 en experimentos de liberación, demostró que la AC V no está participando en la vía de señalización del receptor GPR55 y nos llevó a pensar en otras vías de señalización y en la posible participación de la AC VII ya que se ha demostrado la presencia del ARNm de la AC VII en el núcleo estriado (Nicole Mons et al., 1995 and Matsuoka et al., 1997) y la expresión de la proteína AC VII en este núcleo, así como en las terminales estriato-palidales (Nicole Mons et al. 1998).

Para poder evaluar la participación de la AC VII en esta vía, se utilizó Ara-A o Vidarabina, el cual es un fármaco antiviral utilizado en la clínica para las infecciones por Herpes-virus y que puede inhibir a las ACs a determinadas concentraciones (Brand et al. 2013) al igual que el NKY 80. El uso de NKY 80 a concentraciones mayores para inhibir otras AC se descartó por las grandes cantidades de fármaco necesarias para poder bloquear la AC VII, por lo que se optó por utilizar el Ara-A a para inhibir a la AC VII. Esto previno la liberación de GABA estimulada por el receptor GPR55, lo que nos sugiere que la probable vía de señalización del receptor GPR55 en la estimulación de la liberación de GABA, puede estar dada por la AC VII. La AC VII se agrupa junto con la AC II y la AC IV en una sub-familia de adenilil ciclasas que pueden ser activadas por la sub-unidad $\beta\gamma$ de las proteínas G (Tang et al., 1991 y Jiang et al., 2008). Con lo anterior decidimos realizar experimento de liberación para inhibir la sub-unidad $\beta\gamma$. Para esto se utilizó galeina, inhibidor de la sub-unidad $\beta\gamma$ (Seneviratne et al., 2011) y se observó que este fármaco previene la liberación de GABA estimulada por el receptor GPR55, sugiriendo que la sub-unidad $\beta\gamma$ está participando en la vía de señalización activada por el receptor GPR55. El siguiente paso fue determinar que sub-unidad $\beta\gamma$ de que proteína G (G_i , $G_{12/13}$, G_s o G_q), estaba participando en la liberación de GABA estimulada por el receptor GPR55. Experimentos de liberación en rebanadas de la SNr con toxina pertussis, realizados por nuestro grupo de trabajo, mostraron que la sub-unidad $\beta\gamma$ de la proteína G_i no participa en la

liberación de GABA estimulada por el receptor GPR55, por lo que podemos descartar la sub-unidad $\beta\gamma$ de la proteína G_i . Otra proteína que puede descartarse es la proteína $G\alpha_{13}$ ya que antecedentes muestran que la sub-unidad $\beta\gamma$ de la proteína G_{13} no participa en la activación de las adenilil ciclasas activadas por $\beta\gamma$ (Jiang et al., 2008). Por otra parte, los experimentos realizados por Obara en 2011 demuestran que el receptor GPR55 no se acople a una proteína $G\alpha_s$, esto descarta la posible participación de la sub-unidad $\beta\gamma$ de la proteína G_s . Quedaría por demostrar si la sub-unidad $\beta\gamma$ de la proteína G_q pudiera estar participando en la estimulación de la liberación de GABA por el receptor GPR55 en las terminales estriato-nigrales. Se ha demostrado que la sub-unidad $\beta\gamma$ de la proteína G_q es funcional al activar receptores acoplados a proteínas G_q (Sánchez-Fernández et al. 2014) también se ha observado que la proteína G_q se encuentra en el núcleo estriado (Wang et al. 1995) y además la sub-unidad $\beta\gamma$ de las proteínas G_q puede ser bloqueada por galeina (Li et al. 2015), por lo que la probabilidad de que el receptor GPR55 estimule la liberación de GABA en terminales estriato-nigrales por medio de la sub-unidad $\beta\gamma$ de una proteína G_q es alta.

Otro punto a considerar es el hecho que la activación de esta vía pudiera estar regulada por otras ACs de la sub-familia a la que pertenece la AC VII, sobre todo la AC II, ya que a pesar que no se tienen antecedentes de la presencia de la proteína AC II en las terminales estriato-nigrales, si se ha demostrado la presencia de su ARNm en el núcleo estriado (Nicole Mons et. al. 1995), además las concentraciones de inhibición de Ara-A para la AC VII son muy cercanas a las de la AC II (230 μ M y 250 μ M respectivamente) (Brand et al. 2013) por lo que no debemos descartar la posible participación de la AC II en esta vía.

8 Conclusión.

La dopamina endógena, el receptor D1 y la AC V no participan en la liberación de GABA estimulada por el receptor GPR55 en terminales estriato-nigrales.

La liberación de GABA estimulada por los receptores GPR55 en terminales estriato-nigrales pudiera estar regulada por la AC VII/II activada probablemente por una sub-unidad $\beta\gamma$ de una proteína G_q . (Fig. 12).

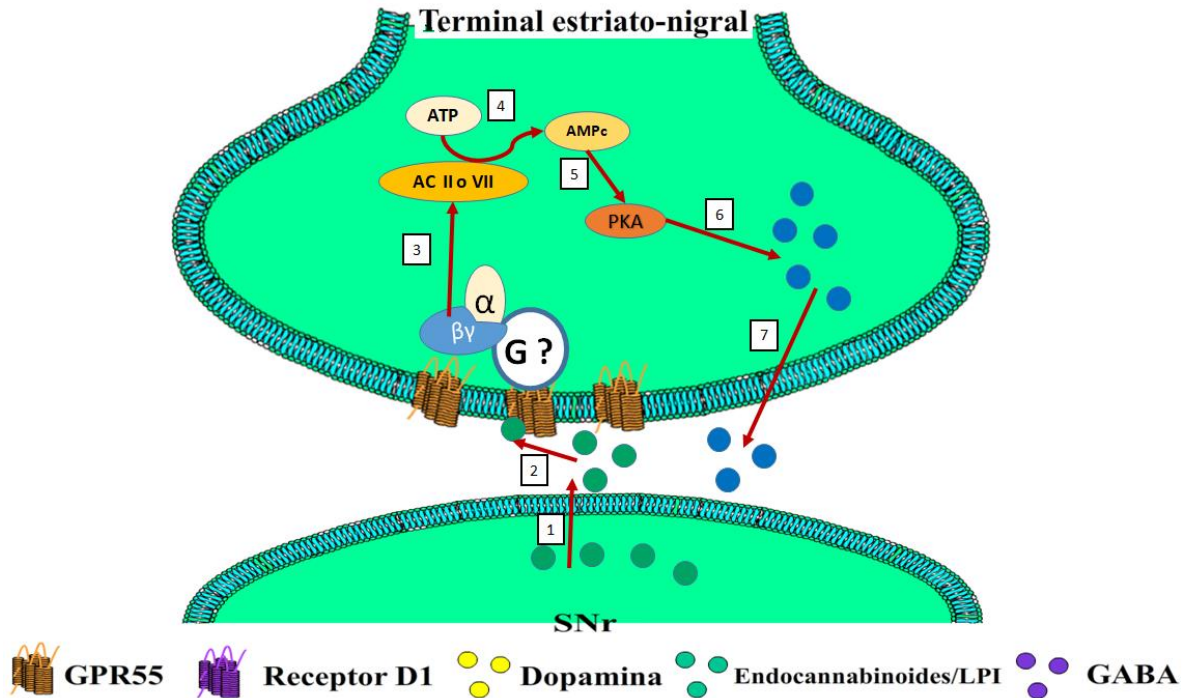


Figura 12. Resumen: GPR55 estimula la liberación de GABA en las terminales estriato-nigrales por una AC activada por la fracción $\beta\gamma$ de una proteína G. 1) Liberación de endocannabinoides de la SNr. 2) Endocannabinoides o LPI exógeno activan receptores GPR55 que se encuentran en las terminales estriato-nigrales activando proteínas G. 3) La sub-unidad $\beta\gamma$ activa la AC VII. 4) Aumento del AMPc por la actividad de la AC. 5) El AMPc activa a la PKA. 6) La PKA favorece la liberación de GABA a la hendidura sináptica.

9 Perspectivas.

- Demostrar la expresión de la enzima AC VII en terminales estriato-nigrales, mediante western blot.
- Evaluar la participación del receptor GPR55 sobre la liberación de GABA en rebanadas de la SNr en ratas hemiparkinsonicas, mediante experimentos de liberación.
- Evaluar la posible dimerización del receptor CB1 con el receptor GPR55 mediante PLA

10 Bibliografía.

Alhouayek, Mireille, Julien Masquelier, and Giulio G. Muccioli. 2018.

“Lysophosphatidylinositols, from Cell Membrane Constituents to GPR55 Ligands.” *Trends in Pharmacological Sciences* 39 (6):586–604.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.02.011>.

Balenga, Nariman A B, Christopher M. Henstridge, Julia Kargl, and Maria Waldhoer. 2011. “Pharmacology, Signaling and Physiological Relevance of the G Protein-Coupled Receptor 55.” *Advances in Pharmacology*.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385952-5.00004-X>.

Bar-Gad, Izhar, Genela Morris, and Hagai Bergman. 2003. "Information Processing, Dimensionality Reduction and Reinforcement Learning in the Basal Ganglia." *Progress in Neurobiology* 71:439–73. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2003.12.001>.

Basavarajappa, Balopal S., Madhu Shivakumar, Vikram Joshi, and Shivakumar Subbanna. 2017. "Endocannabinoid System in Neurodegenerative Disorders." *Journal of Neurochemistry* 142 (5):624–48. <https://doi.org/10.1111/jnc.14098>.

Biasini, Marco, Stefan Bienert, Andrew Waterhouse, Konstantin Arnold, Gabriel Studer, Tobias Schmidt, Florian Kiefer, et al. 2014. "SWISS-MODEL: Modelling Protein Tertiary and Quaternary Structure Using Evolutionary Information." *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press: W252-8. <https://doi.org/10.1093/nar/gku340>.

Bourne, J a. 2001. "SCH 23390: The First Selective Dopamine D1-like Receptor Antagonist." *CNS Drug Reviews* 7 (4):399–414. <https://doi.org/10.1111/j.1527-3458.2001.tb00207.x>.

Brand, Cameron S, Harrison J Hocker, Alemayehu A Gorfe, Claudio N Cavasotto, and Carmen W Dessauer. 2013. "Isoform Selectivity of Adenylyl Cyclase Inhibitors: Characterization of Known and Novel Compounds." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 347 (2). American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics: 265–75. <https://doi.org/10.1124/jpet.113.208157>.

Calabresi, Paolo, Barbara Picconi, Alessandro Tozzi, Veronica Ghiglieri, and Massimiliano Di Filippo. 2014. "Direct and Indirect Pathways of Basal Ganglia: A Critical Reappraisal." *Nature Neuroscience* 17 (8). Nature Publishing Group: 1022–30. <https://doi.org/10.1038/nn.3743>.

Celorio, Marta, Estefanía Rojo-Bustamante, Diana Fernández-Suárez, Elena Sáez, Ander Estella-Hermoso de Mendoza, Christa E. Müller, María J.

-
- Ramírez, Julen Oyarzábal, Rafael Franco, and María S. Aymerich. 2017. "GPR55: A Therapeutic Target for Parkinson's Disease?" *Neuropharmacology* 125 (October). Pergamon: 319–32. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2017.08.017>.
- Chen, J, M DeVivo, J Dingus, A Harry, J Li, J Sui, D J Carty, J L Blank, J H Exton, and R H Stoffel. 1995. "A Region of Adenylyl Cyclase 2 Critical for Regulation by G Protein Beta Gamma Subunits." *Science (New York, N.Y.)* 268 (5214):1166–69. <https://doi.org/10.1126/science.7761832>.
- Florán, Benjamín, Leonor Florán, David Eriij, and Jorge Aceves. 2004. "Activation of Dopamine D4 Receptors Modulates [3 H]GABA Release in Slices of the Rat Thalamic Reticular Nucleus." *Neuropharmacology* 46:497–503. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2003.10.004>.
- Garcia, M, B Floran, J.A Arias-Montaña, J.M Young, and J Aceves. 1997. "Histamine H3 Receptor Activation Selectively Inhibits Dopamine D1 Receptor-Dependent [3H]GABA Release from Depolarization-Stimulated Slices of Rat Substantia Nigra Pars Reticulata." *Neuroscience* 80 (1). Pergamon: 241–49. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00100-0](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00100-0).
- Glatt, Charles E., and Solomon H. Snyder. 1993. "Cloning and Expression of an Adenylyl Cyclase Localized to the Corpus Striatum." *Nature* 361 (6412). Nature Publishing Group: 536–38. <https://doi.org/10.1038/361536a0>.
- Gonzalez, Brenda, Francisco Paz, Leonor Florán, Jorge Aceves, David Eriij, Benjamín Florán, G J Cullinan, et al. 2009. "Cannabinoid Agonists Stimulate [3H]GABA Release in the Globus Pallidus of the Rat When G(i) Protein-Receptor Coupling Is Restricted: Role of Dopamine D2 Receptors." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 328 (3). American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics: 822–28. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.145425>.
- Godlewski, Grzegorz, László Offertáler, Jens A. Wagner, and George Kunos.

-
2009. "Receptors for Acylethanolamides-GPR55 and GPR119." Prostaglandins and Other Lipid Mediators. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2009.07.001>.
- Hervé, Denis. 2011. "Identification of a Specific Assembly of the G Protein Golf as a Critical and Regulated Module of Dopamine and Adenosine-Activated cAMP Pathways in the Striatum." *Frontiers in Neuroanatomy*. <https://doi.org/10.3389/fnana.2011.00048>.
- Jan, C., M. P. Muriel, A. S. Rolland, E. C. Hirsch, and C. François. 2007. "Localization of D1a Dopamine Receptors on Cell Bodies and Axonal Endings in the Substantia Nigra Pars Reticulata of the Rat." *Journal of Neural Transmission*. <https://doi.org/10.1007/s00702-007-0775-8>.
- Jiang, Lily I, Julie Collins, Richard Davis, Iain D Fraser, and Paul C Sternweis. 2008. "Regulation of cAMP Responses by the G 12/13 Pathway Converges on Adenylyl Cyclase VII." <https://doi.org/10.1074/jbc.M803281200>.
- Kargl, Julia, Andrew J Brown, Liisa Andersen, Georg Dorn, Rudolf Schicho, Maria Waldhoer, and Akos Heinemann. 2013. "A Selective Antagonist Reveals a Potential Role of G Protein-Coupled Receptor 55 in Platelet and Endothelial Cell Function S." *The journal of pharmacology and experimental therapeutics J Pharmacol Exp Ther* 346:54–66. <https://doi.org/10.1124/jpet.113.204180>.
- Katona, István. 2009. "Endocannabinoid Receptors: CNS Localization of the CB1 Cannabinoid Receptor." In, 65–86. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-88955-7_3.
- Kim, Kyoung-Shim, Ko-Woon Lee, Kang-Woo Lee, Joo-Young Im, Ji Yeoun Yoo, Seung-Woo Kim, Ja-Kyeong Lee, Eric J Nestler, and Pyung-Lim Han. 2006. "Adenylyl Cyclase Type 5 (AC5) Is an Essential Mediator of Morphine Action." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (10). National Academy of Sciences: 3908–13. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508812103>.

Kuzhikandathil, Eldo V, and Gerry S Oxford. 2002. "Classic D1 Dopamine Receptor Antagonist R-(-)-7-Chloro-8-Hydroxy-3-Methyl-1-Phenyl-2,3,4,5-Tetrahydro-1H-3-Benzazepine Hydrochloride (SCH23390) Directly Inhibits G Protein-Coupled Inwardly Rectifying Potassium Channels." <http://molpharm.aspetjournals.org>.

Lanciego, José L, Natasha Luquin, and José A Obeso. 2012. "Functional Neuroanatomy of the Basal Ganglia." Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009621>.

Lauckner, J. E., J. B. Jensen, H.-Y. Chen, H.-C. Lu, B. Hille, and K. Mackie. 2008. "GPR55 Is a Cannabinoid Receptor That Increases Intracellular Calcium and Inhibits M Current." *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711278105>.

Lehmann, Seneviratne, and A V Smrcka. 2008. "Small Molecule Disruption of G Protein By Subunit Signaling Inhibits Neutrophil Chemotaxis and Inflammation." <https://doi.org/10.1124/mol.107.041780>.

Li, Z., S. Q. He, P. Y. Tseng, Q. Xu, V. Tiwari, F. Yang, B. Shu, et al. 2015. "The Inhibition of High-Voltage-Activated Calcium Current by Activation of MrgC11 Involves Phospholipase C-Dependent Mechanisms." *Neuroscience* 300:393–403. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.05.043>.

Malfitano, Anna Maria, Sreemanti Basu, Katarzyna Maresz, Maurizio Bifulco, and Bonnie N Dittel. n.d. "What We Know and Don't Know About the Cannabinoid Receptor 2 (CB2)." Accessed February 1, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.04.002>.

Marcu, Jahan, Derek M Shore, Ankur Kapur, Megan Trznadel, Alexandros Makriyannis, Patricia H Reggio, and Mary E Abood. 2013. "Novel Insights into CB1 Cannabinoid Receptor Signaling: A Key Interaction Identified between the Extracellular-3 Loop and Transmembrane Helix 2." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 345 (2).

<https://doi.org/10.1124/jpet.112.201046>.

Martinez-Pinilla, E., I. Reyes-Resina, A. Astibia, M. Zamarbide, A. Ricobaraza, G. Navarro, E. Moreno, et al. 2014. "CB1 and GPR55 Receptors Are Co-Expressed and Form Heteromers in Rat and Monkey Striatum." *Experimental Neurology*. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.06.017>.

Marzo, Vincenzo Di, Maurizio Bifulco, and Luciano De Petrocellis. 2004. "The Endocannabinoid System and Its Therapeutic Exploitation." *Nature Reviews Drug Discovery* 3 (9). Nature Publishing Group: 771–84. <https://doi.org/10.1038/nrd1495>.

Matsuoka, I, Y Suzuki, N Defer, H Nakanishi, and J Hanoune. 1997. "Differential Expression of Type I, II, and V Adenylyl Cyclase Gene in the Postnatal Developing Rat Brain." *Journal of Neurochemistry* 68 (2):498–506.

Monakow, K, K Akert, and H Kiinzle. 1978. "Projections of the Precentral Motor Cortex and Other Cortical Areas of the Frontal Lobe to the Subthalamic Nucleus in the Monkey." *Brain Res.* Vol. 33. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F2F00235561.pdf>.

Musella, A., D. Fresegna, F. R. Rizzo, A. Gentile, S. Bullitta, F. De Vito, L. Guadalupi, D. Centonze, and G. Mandolesi. 2017. "A Novel Crosstalk within the Endocannabinoid System Controls GABA Transmission in the Striatum." *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07519-8>.

Naitoy, Kenji. 1990. "Inhibition of Forskolin-Induced Neurite Outgrowth and Protein Phosphorylation by a Newly Synthesized Selective Inhibitor of Cyclic (H-89), of PC12D Pheochromocytoma Cells *" 265 (9):5267–73.

Nambu, Atsushi, Masahiko Takada, Masahiko Inase, and Hironobu Tokunoz. 1996. "Dual Somatotopical Representations in the Primate Subthalamic Nucleus: Evidence for Ordered but Reversed Body-Map Transformations from the Primary Motor Cortex and the Supplementary Motor Area." *The Journal of Neuroscience*. Vol. 16.

<http://www.jneurosci.org/content/jneuro/16/8/2671.full.pdf>.

Nicole Mons, and Dermot M.F. Cooper. 1995. "Adenylate Cyclases: Critical Foci in Neuronal Signaling." *Trends in Neurosciences* 18 (12):536–42. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(95\)98375-9](https://doi.org/10.1016/0166-2236(95)98375-9).

Nicole Mons, A. Harry, P Dubourg, R T Premont, R Iyengar, and D M Cooper. 1995. "Immunohistochemical Localization of Adenylyl Cyclase in Rat Brain Indicates a Highly Selective Concentration at Synapses." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (18). National Academy of Sciences: 8473–77. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7667314>.

Nicole Mons, Masami Yoshimura, and Boris Tabakoff Hiroshi Ikeda, Paula L. Hoffman. 1998. "Immunological Assessment of the Distribution of Type VII Adenylyl Cyclase in Brain." *Brain Research* 788:251–61. https://ac.els-cdn.com/S0006899398000055/1-s2.0-S0006899398000055-main.pdf?_tid=0b7a9035-1d2f-40e8-acd9-456c2bd6c5a1&acdnat=1528304375_592618f2aeaa8a98aaa25ec7b21e310e.a98aaa25ec7b21e310e.

Obara, Yutaro, Sanae Ueno, Yoshimi Yanagihata, and Norimichi Nakahata. 2011. "Lysophosphatidylinositol Causes Neurite Retraction via GPR55, G13 and RhoA in PC12 Cells." Edited by Stuart E. Dryer. *PLoS ONE* 6 (8). Public Library of Science: e24284. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024284>.

Oka, Saori, Keisuke Nakajima, Atsushi Yamashita, Seishi Kishimoto, and Takayuki Sugiura. 2007. "Identification of GPR55 as a Lysophosphatidylinositol Receptor." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 362 (4). Academic Press: 928–34. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2007.08.078>.

Pacher, Pál, Sándor Bátakai, and George Kunos. 2006. "The Endocannabinoid System as an Emerging Target of Pharmacotherapy." *Pharmacological Reviews* 58 (3). American Society for Pharmacology and Experimental

Therapeutics: 389–462. <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.2>.

Parent, André, and Lili-Naz Hazrati. 1995. “Functional Anatomy of the Basal Ganglia. I. The Cortico-Basal Ganglia-Thalamo-Cortical Loop.” *Brain Research Reviews* 20 (1). Elsevier:91–127. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(94\)00007-C](https://doi.org/10.1016/0165-0173(94)00007-C).

Piñeiro, Roberto, and Marco Falasca. 2012. “Lysophosphatidylinositol Signalling: New Wine from an Old Bottle.” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1821 (4). Elsevier B.V.:694–705. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.01.009>.

Ribak, Charles E, James E Vaughn, and Eugene Roberts. 1980. “GABAERGIC NERVE TERMINALS DECREASE IN THE SUBSTANTIA NIGRA FOLLOWING HEMITRANSECTIONS OF THE STRIATONIGRAL AND PALLIDONIGRAL PATHWAYS.” *Brain Research*. Vol. 192. [https://ac.els-cdn.com.access.biblioteca.cinvestav.mx/0006899380908938/1-s2.0-0006899380908938-main.pdf?_tid=3094183d-ca44-478c-88f0-2e1c625f10cb&acdnat=1538691856_b78340ea0ce5dbef894d33b02fe32aae](https://ac.els-cdn.com/access.biblioteca.cinvestav.mx/0006899380908938/1-s2.0-0006899380908938-main.pdf?_tid=3094183d-ca44-478c-88f0-2e1c625f10cb&acdnat=1538691856_b78340ea0ce5dbef894d33b02fe32aae).

Ross, Ruth A. 2009. “The Enigmatic Pharmacology of GPR55.” *Trends in Pharmacological Sciences* 30 (3):156–63. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.12.004>.

Ryberg, E, N Larsson, S Sjögren, S Hjorth, N-O Hermansson, J Leonova, T Elebring, K Nilsson, T Drmota, and P J Greasley. 2007. “The Orphan Receptor GPR55 Is a Novel Cannabinoid Receptor.” *British Journal of Pharmacology* 152 (7). Wiley-Blackwell: 1092–1101. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707460>.

Sanz, Guenhaël, Isabelle Leray, Adeline Muscat, Adrien Acquistapace, Tao Cui, Julie Rivière, Silvia Vincent-Naulleau, Valeria Giandomenico, and Lluís M Mir. 2017. “Gallein, a G β Subunit Signalling Inhibitor, Inhibits Metastatic Spread of Tumour Cells Expressing OR51E2 and Exposed to Its Odorant Ligand.” *BMC Res Notes* 10:541. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2879-z>.

Sawzdargo, Marek, Tuan Nguyen, Dennis K Lee, Kevin R Lynch, Regina Cheng, Henry H Q Heng, Susan R George, and Brian F O 'dowd. 1999. "Identification and Cloning of Three Novel Human G Protein-Coupled Receptor Genes GPR52, CGPR53 and GPR55: GPR55 Is Extensively Expressed in Human Brain." *Molecular Brain Research* 64:193–98. https://ac.els-cdn.com/S0169328X98002770/1-s2.0-S0169328X98002770-main.pdf?_tid=19037906-0845-11e8-b007-00000aacb361&acdnat=1517595539_28a81450a48e02a3f314006a7934130d.

Sánchez-Fernández, Guzmán, Sofía Cabezudo, Carlota García-Hoz, Cristiane Benincá, Anna M. Aragay, Federico Mayor, and Catalina Ribas. 2014. "Gαq Signalling: The New and the Old." *Cellular Signalling* 26 (5):833–48. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.01.010>.

Sánchez-Zavaleta, Rodolfo, Hernán Cortés, José Arturo Avalos-Fuentes, Ubaldo García, José Segovia Vila, David Eriij, and Benjamín Florán. 2018. "Presynaptic Cannabinoid CB2 Receptors Modulate [3H]-Glutamate Release at Subthalamo-Nigral Terminals of the Rat." *Synapse*. <https://doi.org/10.1002/syn.22061>.

Seneviratne, Ampb, Michael Burroughs, Ernest Giralt, and Alan V Smrcka. 2011. "Direct-Reversible Binding of Small Molecules to G Protein By Subunits." *Biochim Biophys Acta* 1814 (9):1210–18. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.05.010>.

Sierra, Salvador, Natasha Luquin, Alberto J. Rico, Virginia Gómez-Bautista, Elvira Roda, Iria G. Dopeso-Reyes, Alfonso Vázquez, et al. 2015. "Detection of Cannabinoid Receptors CB1 and CB2 within Basal Ganglia Output Neurons in Macaques: Changes Following Experimental Parkinsonism." *Brain Structure and Function* 220 (5). Springer Berlin Heidelberg: 2721–38. <https://doi.org/10.1007/s00429-014-0823-8>.

Sylantsev, Sergiy, Thomas P Jensen, Ruth A Ross, and Dmitri A Rusakov. 2013.

“Cannabinoid- and Lysophosphatidylinositol-Sensitive Receptor GPR55 Boosts Neurotransmitter Release at Central Synapses.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (13). National Academy of Sciences: 5193–98. <https://doi.org/10.1073/pnas.1211204110>.

Tang, Wei-Jen, and Alfred G. Gilman. 1991. “Type-Specific Regulation of Adenylyl Cyclase by G Protein $\beta\gamma$ Subunits.” *SCIENCE* 254:98–101.

Utter, Amy A, and Michele A Basso. 2008. “The Basal Ganglia: An Overview of Circuits and Function.” *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 32:333–42. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2006.11.003>.

Wang, Hoau-Yan, Ashiwel S Undie¹, and Eitan Friedman. 1995. “Evidence for the Coupling of Gq Protein to D1-Like Dopamine Sites in Rat Striatum: Possible Role in Dopamine-Mediated Inositol Phosphate Formation.” *MOLECULAR PHARMACOLOGY*. Vol. 48. <http://molpharm.aspetjournals.org/content/molpharm/48/6/988.full.pdf>.

Xi, Zheng-Xiong, Xiao-Qing Peng, Xia Li, Rui Song, Haiying Zhang, Qing-Rong Liu, Hong-Ju Yang, Guo-Hua Bi, Jie Li, and Eliot L Gardner. n.d. “Brain Cannabinoid CB 2 Receptors Modulate Cocaine’s Actions in Mice.” Accessed February 2, 2018. <https://doi.org/10.1038/nn.2874>.

Yamashita, Atsushi, Saori Oka, Takashi Tanikawa, Yasuhiro Hayashi, Yoko Nemoto-Sasaki, and Takayuki Sugiura. 2013. “The Actions and Metabolism of Lysophosphatidylinositol, an Endogenous Agonist for GPR55.” *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2013.05.004>.

Yoshimura, M, P H Wu, P L Hoffman, and B Tabakoff. 2000. “Overexpression of Type 7 Adenylyl Cyclase in the Mouse Brain Enhances Acute and Chronic Actions of Morphine.” *Mol.Pharmacol.* 58 (5):1011–16. <https://doi.org/10.1124/mol.58.5.1011>.

Zhang, Hai-Ying, Ming Gao, Qing-Rong Liu, Guo-Hua Bi, Xia Li, Hong-Ju Yang, Eliot L Gardner, Jie Wu, Zheng-Xiong Xi, and Leslie Lars Iversen. n.d. "Cannabinoid CB 2 Receptors Modulate Midbrain Dopamine Neuronal Activity and Dopamine-Related Behavior in Mice." Accessed February 2, 2018. <https://doi.org/10.1073/pnas.1413210111>.

Zhuang, Xiaoxi, Leonardo Belluscio, and Rene Hen. n.d. "G OLF₁ Mediates Dopamine D₁ Receptor Signaling." Accessed February 1, 2018. <http://www.jneurosci.org/content/jneuro/20/16/RC91.full.pdf>.