



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**MODULACIÓN DE LA NEUROTRANSMISIÓN GABAÉRGICA Y
GLUTAMATÉRGICA EN LAS VÍAS ESTRIATO-NIGRAL Y SUBTÁLAMO-
NIGRAL POR LOS RECEPTORES CB2 Y GPR55.**

TESIS DE DOCTORADO

Que presenta

M en C Rodolfo Enedino Sánchez Zavaleta

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

En la especialidad de

NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Director de tesis:

Dr. Benjamín Florán Garduño

2018

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio 4 del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Benjamín Florán Garduño.

Agradecimientos especiales al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por las facilidades otorgadas al brindarme la beca número 420014. Y al proyecto de Ciencia Básica # 152326 otorgado al Dr. Benjamín Florán.

AGRADECIMIENTOS A:

Dr. BENJAMÍN FLORÁN GARDUÑO

Le agradezco por el apoyo que me brindo para la realización de éste trabajo
y por sus enseñanzas durante mi estancia en el laboratorio

A mi comité tutorial integrado por los doctores:

Dr. JOSÉ ANTONIO ÁRIAS MONTAÑO

Dr. ALFONSO DANIEL DÍAZ FONSECA

Dr. RICARDO FÉLIX GRIJALVA

Dr. JOSÉ SEGOVIA VILA

Por sus valiosos comentarios y observaciones para realizar el presente
trabajo.

Al personal del laboratorio por su apoyo técnico y la facilitación del material y
reactivos necesarios.

ÍNDICE

1 ANTECEDENTES	1
1.1 La marihuana y el sistema de endocannabinoides.....	1
1.2 Biosíntesis, transporte y catabolismo de la anandamida y el 2-araquidonilglicerol.....	2
1.3 Clasificación de los receptores a cannabinoides.....	5
1.3.1 El receptor CB1	5
1.3.2 El receptor CB2	8
1.3.3 Nuevos receptores a cannabinoides: GPR55	10
1.4 El sistema endocanabinoide en los ganglios basales	11
1.5 Heterómeros de receptores acoplados a proteínas G	13
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
3 HIPÓTESIS	15
4 OBJETIVO GENERAL	15
5 OBJETIVOS PARTICULARES	15
6 METODOLOGÍA	16
6.1 Sujetos de experimentación	16
6.2 Obtención de las rebanadas de cerebro.....	16
6.3 Liberación de [³ H]-GABA y [³ H]-glutamato	16
6.4 Determinación de la radioactividad.....	17
6.5 Cultivos neuronales primarios	17
6.6 RT-PCR	18

6.7 Inmunofluorescencia en tejido y cultivos celulares.....	18
6.8 Ensayo de proximidad de ligando (PLA)	19
6.9 Lesión del STN y estriado	20
6.10 Obtención de sinaptosomas	20
6.11 Western blot.....	21
6.12 Co-inmunoprecipitación	21
6.13 Drogas y anticuerpos	22
7 RESULTADOS	25
7.1 La proteína y el RNA mensajero para el receptor CB2 se expresan en neuronas del núcleo subtalámico de rata	25
7.2 La activación del receptor CB2 disminuye la liberación de [³ H]-glutamato en la sustancia negra reticulada de rata a través del complejo β/γ y por la inhibición de los canales de calcio tipo P/Q	27
7.3 El receptor CB1 forma heterómeros con el receptor CB2 en el subtálamo y en terminales subtálamo-nigrales	31
7.4 El receptor GPR55 se localiza en la vía directa de los ganglios basales	33
7.5 La activación de GPR55 aumenta la liberación de [³ H]GABA en rebanadas de la sustancia negra reticulada.....	35
7.6 La estimulación en la liberación de [³ H]GABA inducido por el lisofosfatidilinositol es independiente de reservorios intracelulares de Ca ²⁺	38
7.7 El efecto estimulador de GPR55 sobre la liberación de GABA depende de la proteína cinasa A (PKA) y de la formación de AMPc	41
7.8 Participación de las proteínas Gs/olf y de las isoformas 5 y 6 de la adenilato ciclasa en la estimulación de la liberación inducida por el lisofosfatidilinositol	42
7.9 El receptor CB1 forma heterómeros con GPR55 en la vía directa de los ganglios basales.....	44
7.10 El agonista del receptor CB1 (ACEA) potencia el aumento en la liberación de [³ H]GABA estimulado por del LPI en la SNr	49

7.12 La activación del receptor CB1 estimula la formación del heterómero CB1-GPR55 en cultivos neuronales primarios del estriado	51
8 DISCUSIÓN	53
8.1 CB2R se expresa en neuronas del STN y en terminales subtálamo-nigrales	53
8.2 El receptor CB2 modula la neurotransmisión glutamatérgica en las terminales subtálamo nigrales	54
8.3 El efecto inhibitorio sobre la liberación de [³ H]glutamato por la activación del receptor CB2 es dependiente del complejo Giβ/γ y de los canales de calcio tipo P/Q	55
8.4 El receptor CB2 forma heterómeros con el receptor CB1 en la vía subtálamo-nigral. ..	57
8.5 Expresión del receptor GPR55 en la vía directa de los ganglios basales	58
8.6 La activación del receptor GPR55 aumenta la liberación de [³ H]GABA en la vía estriato-nigral.....	59
8.7 La liberación de [³ H]GABA estimulada por el LPI no depende de la PLC y de Ca ²⁺ de reservorios intracelulares	61
8.8 El LPI estimula la formación de AMPc y la activación de la PKA en la SNr, efecto independiente de la proteína Gas y de la AC 5/6	62
8.9 Expresión funcional del heterómero CB1-GPR55 en las terminales estriato-nigrales...	63
9 CONCLUSIONES	66
10 PERSPECTIVAS	67
11 BIBLIOGRAFÍA	68
12 ANEXOS	86

RESUMEN

Se ha descrito la presencia de receptores a cannabinoides diferentes a CB1 en Sistema Nervioso Central, en este trabajo nos enfocamos al estudio del receptor a cannabinoides tipo 2 (CB2) y del receptor huérfano GPR55 en la vía subtálamo-nigral y estriato-nigral, respectivamente; además de evaluar la probable formación de heterómeros con el receptor CB1.

En resultados correspondientes al proyecto de maestría observamos que: 1) El receptor CB2 se expresa en el núcleo subtalámico, 2) Su activación en las terminales subtálamo-nigrales disminuye la liberación de [³H]glutamato estimulada por potasio y 3) La administración unilateral de GW833972 en la sustancia negra reticulada (SNr) induce giros contralaterales al sitio de administración. En este trabajo detectamos el RNA mensajero de CB2 por RT-PCR y la proteína para el receptor CB2 por inmunofluorescencia, particularmente, en las neuronas glutamatérgicas del subtálamo y en cultivos neuronales primarios de este núcleo. El GW833972A, GW405833 y JHW 133 disminuyen la liberación de [³H]glutamate efecto que es dependiente de la concentración, sin embargo, el GW833972A es el más potente. La inhibición de la liberación inducida por el GW833972A se previene con los antagonistas del receptor CB2 AM-630 y JTE-907 y es sensible a la galeína y a la toxina de *Bordetella pertussis*, lo cual sugiere que el efecto es mediado por el complejo Gi_{βγ}. La agatoxina-TK (bloqueador de los canales de Ca²⁺ tipo P/Q) también inhibe la liberación de [³H]glutamato y tiene efectos oclusivos con el GW833972A. Nuestros resultados sugieren que la activación del receptor CB2 presináptico inhibe la liberación de [³H]glutamato en las terminales

subtálamo-nigrales debido a la modulación de los canales de Ca^{2+} tipo T por el complejo $\text{G}\beta\gamma$. Finalmente, detectamos al heterodímero CB1-CB2 con el ensayo de proximidad de ligando (PLA) en el núcleo subtalámico y en la sustancia negra reticulada de rata.

Por otra parte, a través de inmunofluorescencia detectamos en el estriado dorso-lateral de rata la expresión del receptor GPR55 en células positivas a sustancia P, lo que sugiere su localización en neuronas espinosas medianas (MSN) de la vía directa de los ganglios basales. La lesión del estriado dorso-lateral con ácido kaínico disminuye el 50 % de la expresión de GPR55 en sinaptosomas de la SNr y previene el efecto del lisofosfatidilinositol (LPI) sobre la liberación de [^3H]GABA, estos resultados indican que GPR55 se expresa en las terminales estriato-nigrales. Los dos agonistas del receptor GPR55 LPI y O-1602 aumentan la liberación de [^3H]GABA estimulada por potasio, efecto dependiente de la concentración y que se previene con los antagonistas de GPR55 CID16020046 y cannabidiol (CBD). La estimulación de la liberación inducida por el LPI es independiente de reservorios intracelulares de Ca^{2+} y de la fosfolipasa C, pero dependiente de Ca^{2+} extracelular y de la formación de AMPc. De forma interesante, el efecto del LPI no involucra la activación de las proteínas $\text{G}\alpha_{s/olf}$ y de la adenilato ciclasa 5/6.

A través de co-inmunoprecipitación y de PLA identificamos que el receptor CB1 forma heterómeros con el receptor GPR55 en el soma de MSN de la vía directa y en las aferentes estriato-nigrales, la co-activación del receptor CB1 con ACEA potencia el aumento en la liberación de [^3H]GABA en rebanadas de la SNr inducida por el LPI, efecto independiente de la toxina de *Bordetella pertussis*. Finalmente, en cultivos primarios de MSN la

incubación durante 30 minutos con el agonista del receptor CB1 (ACEA) incrementa el número de heterómeros CB1-GPR55 evaluado por PLA. En conjunto, los resultados indican que: (1) el receptor GPR55 se localiza en las terminales estriato-nigrales, (2) su activación estimula la liberación de [³H]GABA en la SNr y la formación de AMPc en sinaptosomas y (3) GPR55 forma heterómeros funcionales con el receptor CB1 que modulan la liberación de [³H]GABA.

ABSTRACT

The presence of cannabinoid receptors distinct from CB1 receptor has been described in Central Nervous System (CNS), in this work we focused on the study of the cannabinoid receptor type 2 and the orphan receptor GPR55 in the subthalamo-nigral and striatonigral pathways, respectively; in addition to the possible the formation of heteromers with CB1 receptor.

Previously we found that: (1) CB2 receptors are expressed in the subthalamic nucleus, (2) CB2 receptor activation in subthalamo-nigral terminals decreases the K⁺-induced [³H]glutamate release and (3) unilateral administration of GW833972A in the substantia nigra reticulate (SNr) enhances the number of contralateral turns. In this work we detected CB2 receptor messenger RNA using RT-PCR and CB2 protein with immunofluorescence, particularly in glutamatergic neurons of subthalamus both in tissue and in primary neuronal cultures. GW833972A, GW405833 and JHW 133, three CB2R agonists dose-dependent inhibited K⁺-induced [³H]-glutamate release in slices of SNr, however, GW833972A exhibited higher potency (IC₅₀ = 126 nM, CI ranging from 65 to 246 nM). The inhibitory effect of this compound is prevented with CB2 receptor antagonists AM-630 and JTE-907 and is sensitive to gallein and pertussis toxin, this suggests that Giβγ mediates the effect. Agatoxin-TK (a P/Q type Ca²⁺ channel blocker) also decrease [³H]glutamate release and has occlusive effects with GW833972A. Our results suggests that the activation of presynaptic CB2 receptor inhibits [³H]Glutamate release in subthalamo-nigral terminals by P/Q-channels

modulation through the $G_i\beta\gamma$ subunit. Finally we found the CB1-CB2 heterodimer using proximity ligation assay (PLA) in the subthalamic nucleus and in the SNr of the rat.

On the other hand, through immunofluorescence we detected that GPR55 receptor is expressed in positive cells to substance P in the dorso-lateral striatum of rat, suggesting its presence in medium spiny neurons (MSN) in the direct pathway of the basal ganglia. Dorso-lateral lesions with kainic acid reduce 50 % of GPR55 protein expression in synaptosomal fraction of the SNr and prevents the lysophosphatidylinositol (LPI) effect on [^3H]GABA release, indicating that GPR55 is expressed in striatonigral terminals. Two GPR55 agonists LPI and O-1602 increase K^+ -stimulated [^3H]GABA release in a dose-dependent fashion, this effect was prevented with the GPR55 antagonists CID16020046 and cannabidiol. Stimulation of LPI-induced release is not dependent of intracellular stores of Ca^{2+} and phospholipase C, but is dependent of extracellular Ca^{2+} and cAMP formation. Interestingly, the LPI effect do not involve $G\alpha_{s/olf}$ and adenylyl cyclase 5/6 activation.

Through co-immunoprecipitation and PLA we identify the CB1-GPR55 heterodimer in the substance P-positive MSN and in their axon projections to the SNr, the co-activation of CB1 receptor amplify the increase of LPI-induced [^3H]GABA release in SNr slices, an effect that is not sensitive to Pertussis toxin. Finally, in primary neuronal cultures of MSN the incubation for 30 minutes with CB1 receptor agonist ACEA enhances the number of CB1-GPR55 heteromers evaluated by PLA. Taken together, our findings indicate that: (1) GPR55 receptor is expressed at presynaptic level in striatonigral terminals, (2) its activation estilulated [^3H]GABA release in the SNr and enhance cAMP production in synaptosomal

fractions and 3) GPR55 receptors form functional heteromers with CB1 cannabinoid receptor to modulate [³H]GABA release.

ABREVIATURAS

2-AG: 2-araquidonilglicerol

AC: Adenil-ciclasa

AEA: Anandamida

BSA: Albúmina sérica bovina

CB1: Receptor a cannabinoides tipo 1

CB2: Receptor a cannabinoides tipo 2

DHK: Ácido dihidroxikaínico

ECS: Sistema de endocannabinoides

EPSP: Potenciales excitadores post-sinápticos

ERK: Cinasas reguladas por señales extracelulares

FSK: Forskolina

GABA: Ácido gama-aminobutírico

GPCR: Receptor acoplado a proteína G

GPe: Globo pálido externo

GPI: Globo pálido interno

IC₅₀: Concentración inhibitoria 50

InC: Intervalo de confianza

IP₃: inositol-1,4,5-trifosfato

K-H: Krebs-Henseleit

KA: Ácido kaínico

LPI: Lisofosfatidilinositol

MSN: Neuronas espinosa medianas

Nac: Núcleo accumbens

PBS: Solución *buffer* de fosfatos

PLA: Ensayo de proximidad de ligando

PLA2: Fosfolipasa A 2

PLC: Fosfolipasa C

PTX: Toxina pertussis

RNA_m: RNA mensajero

SNC: Sistema Nervioso Central

SNr: Sustancia negra reticulada

STN: Núcleo subtalámico

VGCC: Canales de calcio activados por voltaje

VTA: Área ventral tegmental

Δ⁹-THC: Delta-9-tetrahidrocanabinol

MODULACIÓN DE LA NEUROTRANSMISIÓN GABAÉRGICA Y GLUTAMATÉRGICA EN LAS VÍAS ESTRIATO-NIGRAL Y SUBTÁLAMO- NIGRAL MEDIADA POR LOS RECEPTORES CB2 Y GPR55

1. ANTECEDENTES

1.1 La marihuana y el sistema de endocannabinoides

La marihuana, también conocida como *Cannabis sativa* tiene una estrecha relación con la humanidad más que ninguna otra planta. Hay indicios arqueológicos de que era cultivada desde el año 8000 aC (Robinson, 1999); en China inicialmente fue utilizada para la obtención de fibras y más tarde para la fabricación de papel (Zuardi, 2006). Es difícil precisar con exactitud en que momento se comenzó a usar con fines recreacionales, pero actualmente es una de las drogas de abuso de mayor consumo alrededor del mundo (Adams y Martin, 1996). Sin embargo, la marihuana no sólo ha sido usada con fines recreacionales, también se ha utilizado con propósitos medicinales desde tiempos milenarios, el primer reporte hace referencia al año 2700 aC, registrado en la farmacopea más antigua del mundo “pen-ts’ao ching” en la época del emperador Shen-Nung (Zuardi, 2006).

En las primeras décadas del siglo XX el uso de cannabis como medicina disminuyó significativamente, los principales factores que propiciaron este evento fueron la dificultad para aislar el principio activo, aunado a factores legales y su reemplazo por opiáceos y barbitúricos (Zuardi, 2006). El uso de los cannabinoides en la medicina occidental resurgió después del aislamiento y descubrimiento de la estructura del delta-9-tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC), principal componente psicoactivo de la marihuana (Gaioni y Mechoulam, 1964), y el consecuente aumento en el número de estudios acerca de los efectos fisiológicos de la marihuana hasta el descubrimiento del sistema de endocannabinoides (ECS), el cual está constituido por receptores a cannabinoides, compuestos endógenos que activan a estos receptores (endocannabinoides) y enzimas biosintéticas y catabólicas de los endocannabinoides (Piomelli, 2003).

En el Sistema Nervioso Central (SNC) el sistema de endocannabinoides modula múltiples procesos fisiológicos como la inflamación (Pertwee, 2005), el aprendizaje y memoria (Wise y cols., 2009), la conducta motora (Di Marzo y cols., 2000), la adicción (Maldonado y cols., 2006), la sensación de dolor (Calignano y cols., 1998), el control del apetito (Di Marzo y cols., 2001), la neuroprotección (Sánchez y García-Merino, 2012), entre otros. La mayor parte de estos efectos son atribuidos a la activación de los receptores a cannabinoides tipo 1 (CB1) y tipo 2 (CB2) (Mackie, 2008). Estos receptores son activados por los cannabinoides derivados de la planta *Cannabis sativa* (fitocannabinoides), por cannabinoides sintéticos y por endocannabinoides.

Los endocannabinoides se comportan como mensajeros retrógrados, es decir, se sintetizan a nivel post-sináptico y activan a sus blancos moleculares en la presinapsis (Piomelli, 2003). Los dos endocannabinoides más representativos son la anandamida (AEA), aislada a partir del cerebro de cerdo y considerada como un agonista parcial de los receptores a cannabinoides (Devane y cols., 1992) y el 2- araquidonilglicerol (2-AG) aislado del intestino de perro y con un comportamiento de agonista total (Mechoulam y cols., 1995). Existen otros compuestos con propiedades cannabinomiméticas: la N-araquidonildopamina, el noladinether, la palmitoiletanolamida, la oleoiletanolamida y la virodamina. A continuación, abordaremos aspectos generales de la AEA y el 2-AG.

1.2 Biosíntesis, transporte y catabolismo de la AEA y el 2-AG

En general, los endocannabinoides tienen como precursores a fosfolípidos de la membrana plasmática o de membranas intracelulares. La N-araquidoniletanolamina o AEA fue el primer endocanabinoide aislado (Devane y cols., 1992); su biosíntesis inicia a partir de glicerofosfolípidos de membranas intracelulares y fosfatidiletanolamida, ambos son sustratos de la enzima N-aciltransferasa (NAT) para la producción de N-araquidonilfosfatidiletanolamida (NArPE), éste es el sustrato de la enzima fosfolipasa D (PLD) específica para N-acilfosfatidiletanolamida, la cual sintetiza AEA (Di Marzo y cols., 2004). Existen otras dos vías para la síntesis de AEA a partir de NArPE: por medio del dominio 4 de la α/β hidrolasa (ABHD4) y la fosfolipasa A2 de secreción (sPLA2) se

producen glicero-pAEA y Liso-NArPE, respectivamente; estos compuestos son transformados a AEA por las enzimas glirerofosfodiesterasa 1 (GDE1) y LisoPLD. Después de su síntesis, la AEA se almacena en adiposomas, los cuales funcionan como reservorios y como medios de transporte entre las membranas intracelulares y la membrana plasmática (Maccarrone, 2017).

Existen evidencias experimentales que sustentan la existencia de proteínas intracelulares de unión a la anandamida (AIBPs, por sus siglas en inglés), por ejemplo, la proteína de choque térmico 70 (HSP70), las proteínas de unión a ácidos grasos 5 y 7 (FABP 5 y 7) y la albúmina son candidatos a AIBPs; sin embargo, no conservan una homología entre sí ni una organización del dominio de unión a lípidos (Maccarrone y cols., 2010). Las AIBPs regulan el transporte de anandamida entre organelos, la membrana plasmática y los adiposomas, los cuales han sido propuestos como los reservorios de AEA en citoplasma (Oddi y cols., 2008). El transporte extracelular de la AEA ha sido un tema muy debatido, se ha sugerido que la anandamida se libera al medio extracelular por difusión pasiva dependiente de su hidrólisis intracelular por la amida hidrolasa de ácidos grasos 1 (FAAH 1) (Kaczocha y cols., 2006); por otra parte, evidencia experimental sugiere la existencia de una proteína de transporte de endocannabinoides (EMT) en la membrana plasmática, aunque hasta la fecha se desconoce su identidad molecular (Maccarrone, 2017).

El 2-AG es el endocanabinoide más abundante en el SNC, con una concentración de 170 veces más que la anandamida (Stella y cols., 1997). Funciona como un ligando CB1/CB2 y al igual que la anandamida se sintetiza en la post-sinápsis, aunque recientemente se ha observado que la microglía también es una fuente de 2-AG en condiciones de neuroinflamación (Carrier y cols., 2004). El 2-AG es producido a partir de la hidrólisis del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) por parte de la fosfolipasa C β (PLC- β) para generar diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-trifosfato (IP3), a partir del DAG las enzimas diacilglicerol lipasa α y β (DAGL- α y DAGL- β) sintetizan el 2-AG (Murataeva y cols., 2014). El transporte de el 2-AG dentro y fuera de la célula ha sido menos estudiado con respecto al de la anandamida, sin embargo, existe evidencia experimental que propone la unión de el 2-AG con la proteína de unión de ácidos grasos 5 (FABP5), la cual podría fungir como un transportador intracelular (Nicolussi y cols., 2014); con respecto al

transporte extracelular se ha sugerido la existencia de una proteína transportadora de 2-AG en la membrana plasmática de células humanas de astrocitoma (Piomelli y cols., 1999), sin embargo, es necesario realizar más estudios para explorar el transporte intra y extracelular de este endocanabinoide.

Con respecto al metabolismo del 2-AG, este es transformado a ácido araquidónico y glicerol por la enzima monoacilglicerol lipasa (MAGL) (Fig. 1), responsable del 85 % de la hidrólisis del 2-AG en el cerebro, las serinas hidrolasas con dominios α/β 6 y 12 (ABHD6 y ABHD12) también pueden hidrolizar al 2-AG, aunque con una eficacia del 9 y 4 %, respectivamente. Además de las enzimas anteriores, el 2-AG puede ser metabolizado por la ciclooxigenasa-2 (COX2), la lipooxigenasa (LPX) y el citocromo P450 (cyt P450) (Blankman y cols., 2007).

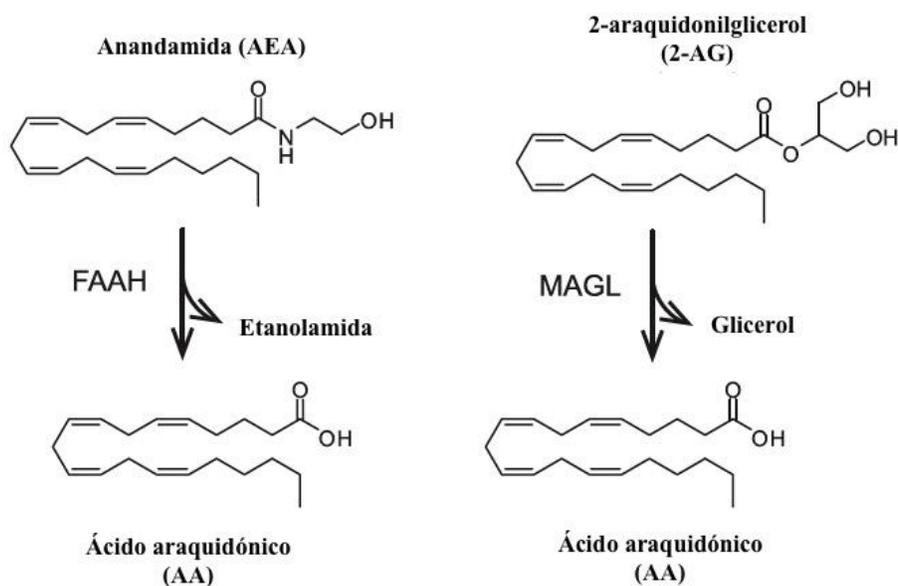


Figura 1. Hidrólisis de los endocanabinoides. Se representa la estructura química de los dos principales endocanabinoides en SNC: anandamida y 2-araquidomilglicerol (2-AG), los cuales son degradados por las enzimas amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) y monoacilglicelo lipasa (MAGL), respectivamente. Los productos de la hidrólisis son ácido araquidónico (AA), etanolamida y glicerol. Modificado de Blankman y Cravatt (2013).

1.3 Clasificación de los receptores a cannabinoides

De forma general los receptores a cannabinoides pueden clasificarse en metabotrópicos, ionotrópicos y nucleares. Los principales receptores metabotrópicos son CB1 y CB2, mientras que otros GPCRs como GPR55, GPR119 y GPR18 se han propuesto como receptores a cannabinoides (Brown, 2007; Penumarti y Abdel-Rahman, 2014). Por otra parte, en reportes recientes se ha observado que algunos cannabinoides pueden activar a los canales TRP (Receptores de Potencial Transitorio) TRPV1, TRPA1, TRPM1, TRPM8, TRPMC1 (De Petrocellis y cols., 2017). Finalmente, endocannabinoides como la anandamida y la oleoiletatolamida se comportan como agonistas del receptor activado por proliferador del peroxisoma α y γ (Pistis y Melis, 2010). En este proyecto nos enfocaremos en los receptores CB1, CB2 y GPR55 por su amplia expresión en núcleos de los ganglios basales.

1.3.1 El receptor CB1

El receptor CB1 fue el primer receptor a cannabinoides clonado a partir de una biblioteca de DNA de rata, inicialmente se consideró como un receptor huérfano perteneciente a la familia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) (Matsuda y cols., 1990), un año mas tarde se identificó al receptor CB1 en humanos (Gerard y cols., 1991). Tiene una expresión generalizada en órganos y tejidos como el páncreas, testículos, adipocitos, linfocitos T, pulmón, Sistema Nervioso Central y Periférico, entre otros tejidos. Particularmente en SNC se considera el GPCR de mayor expresión (Matyas y cols., 2006); a través de técnicas de unión a radioligando se ha observado una amplia expresión de los receptores a cannabinoides en el SNC, particularmente en el hipocampo, el cerebelo, la corteza, el hipotálamo, el bulbo olfatorio y los ganglios basales (Herkenham y cols., 1991a).

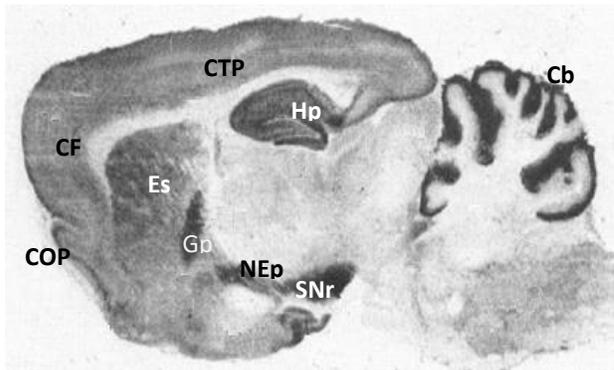


Figura 2. Localización de los receptores canabinoides en el SNC. A) Autorradiografía de un corte sagital de cerebro de rata que muestra el sitio de unión de ^3H -CP55, 940 a receptores canabinoides. Se muestra una alta densidad de los receptores CB1 en el cerebelo (Cb), el hipocampo (Hp), la sustancia nigra reticulada (SNr), el núcleo entopendocular (NEp), el globo pálido (Gp), la corteza temporoparietal (CTP), el estriado (Es), la corteza frontal (CF) y la corteza olfatoria primaria (COP) (modificado de Herkenham y cols., 1991a).

CB1R y CB2R son receptores metabotrópicos con una estructura de 7 dominios transmembranales que de forma clásica se acoplan a una proteína $G_{i/o}$ (Pertwee y cols., 2010). CB1R se ha denominado como el receptor a canabinoides central por su amplia expresión en SNC, con una ubicación subcelular principalmente a nivel presináptico en el hipocampo, la corteza, el cerebelo, el globo pálido, la sustancia nigra reticulada, entre otros (Herkenham y cols., 1991a; Fig. 2). Los endocannabinoides funcionan como mensajeros retrógrados, es decir, tras un aumento de calcio en la postsinapsis mediado por el receptor NMDA, canales de calcio dependientes de voltaje y/o GPCRs acoplados a proteínas $G_{q/11}$ se promueve la síntesis y liberación de endocannabinoides al espacio sináptico, en este sitio activan al receptor CB1 de la presinapsis, el cual debido a su acople con una proteína $G_{i/o}$ permite que la subunidad α del heterotrímero disminuya la actividad de la enzima adenilato ciclasa (AC), mientras que el complejo $\beta\gamma$ puede inhibir a los canales de calcio tipo P/Q y activar a los canales de potasio GIRK, cualquiera de estas vías de señalización conlleva a una disminución en la liberación de neurotransmisores (Di Marzo y cols., 2004) (Fig. 3).

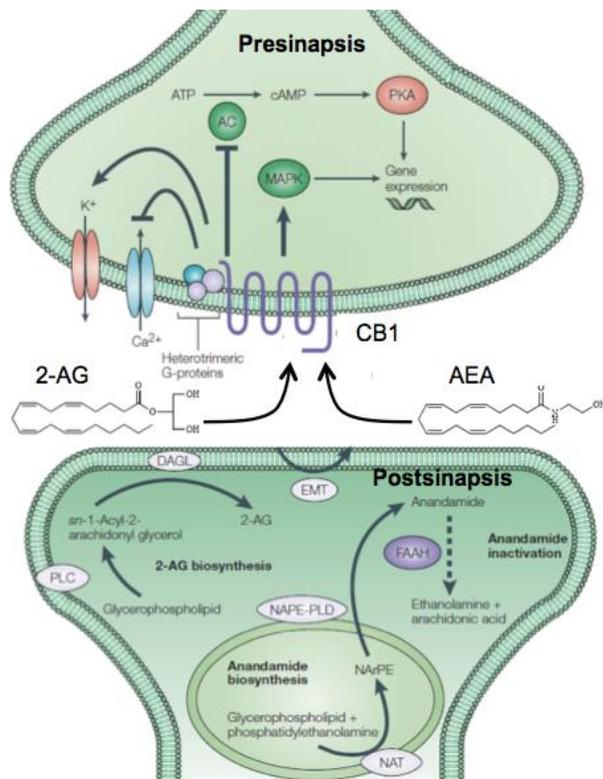


Figura 3. Señalización retrógrada mediada por endocannabinoides en la sinapsis. La anandamida (AEA) sintetizada por las enzimas NAT-NAPE-PLD y el 2-araquidonilglicerol (2-AG) sintetizado por la DAGL en la postsinapsis son liberados a la hendidura sináptica donde activan al receptor CB1 presináptico, el cual se acopla a una proteína $G_{i/o}$ y genera una subsecuente inhibición de la vía AMPc-PKA, además de promover vías de señalización mediadas por MAPK. Por otra parte, el receptor CB1 a través de las subunidades $\beta\gamma$ puede bloquear a los canales de calcio activados por voltaje tipo N y P/Q y/o activar a canales de potasio GIRK, en consecuencia, la liberación de neurotransmisores disminuye (Modificado de Di Marzo y cols., 2004).

1.3.2 El receptor CB2

CB2R fue clonado por primera vez a partir de la biblioteca de DNAc de células de leucemia promielocítica humana, tiene una homología del 68 % con el receptor CB1 (Munro y col., 1993). Inicialmente fue considerado como el receptor a canabinoides periférico, con una alta expresión en células del sistema inmune y órganos como el bazo y el riñón (Howlett y cols., 2002), los primeros reportes de la presencia de CB2R en SNC sugerían que se expresaba en la microglía perivascular y microglía reactiva bajo condiciones de neuroinflamación como en la enfermedad de Alzheimer (Fernández-Ruíz y cols., 2005; Benito y cols., 2003), más tarde, con el uso de técnicas inmunohistoquímicas se demostró su localización en neuronas del hipocampo, el cerebelo, la corteza, el tálamo y los ganglios basales (Van Sickle y cols., 2005, Gong y cols., 2006, Brusco y cols., 2006). A pesar de que su presencia en el cerebro ha sido controversial por la falta de anticuerpos específicos para CB2, con el desarrollo de *primers* específicos, animales *knock-out* y agonistas selectivos para este receptor actualmente existe amplia evidencia electrofisiológica, genética, neuroquímica e histoquímica que apoya su presencia en el cerebro, aunque su nivel de expresión con respecto a CB1R es mucho menor (Onaivi, 2011).

Con respecto a la función de CB2R, de forma canónica y al igual que el receptor CB1, se acopla a una proteína $G\alpha_{i/o}$ e inhibe la actividad de la adenilato ciclasa, estimula a las cinasas activadas por mitógeno (MAPK) y a la vía PI3K, además de favorecer la síntesis de ceramida (Dhopheshwarkar y Mackie, 2016). La mayor parte de los estudios en los que se evalúa su vía de señalización se han realizado en células del sistema inmune o en sistemas de transfección heterólogos, sin embargo, en SNC den Boon y cols. (2012) proponen que se localiza en membranas intracelulares neuronales de la capa II y III de la corteza prefrontal medial, donde tras su activación la frecuencia de disparo neuronal disminuye. Por otra parte, cuando se transfecta al receptor CB2 en cultivos autápticos de hipocampo proveniente de ratones *knock-out* a CB1R se restablece la supresión de la excitación por despolarización (DSE) (Atwood y cols., 2012a) y en cultivos primarios de hipocampo la activación crónica de CB2 aumenta la frecuencia de las corrientes excitadoras postsinápticas miniatura (Kim y Li, 2014).

A pesar de la baja expresión de CB2R con respecto al receptor CB1, su activación disminuye la liberación de dopamina en el núcleo accumbens y previene el número de autoadministraciones de cocaína (Xi y cols., 2011); por otra parte, en el área ventral tegmental (VTA) el agonista JWH-133 disminuye el disparo neuronal (Zhang y cols., 2017). La regulación de la excitabilidad neuronal que ejerce el receptor CB2 se asocia a la modulación de la liberación de neurotransmisores como el GABA en hipocampo (Andó y cols., 2012) y la dopamina en núcleo accumbens (Xi y cols., 2011). En nuestro grupo de trabajo hemos encontrado que la activación de CB2R disminuye la liberación de [³H]glutamato en la sustancia negra reticulada; después de la lesión del núcleo subtalámico con ácido kaínico la expresión de este receptor disminuye un 33 % en terminales sinápticas de la SNr y el efecto del agonista CB2 sobre la liberación desaparece, por lo cual, sugerimos que CB2R se encuentra en las terminales de la vía subtálamo-nigral y modula la liberación de glutamato. Al evaluar la vía de señalización determinamos que este efecto es mediado por los canales de calcio tipo P/Q (Sánchez-Zavaleta R. 2013. Tesis de Maestría).

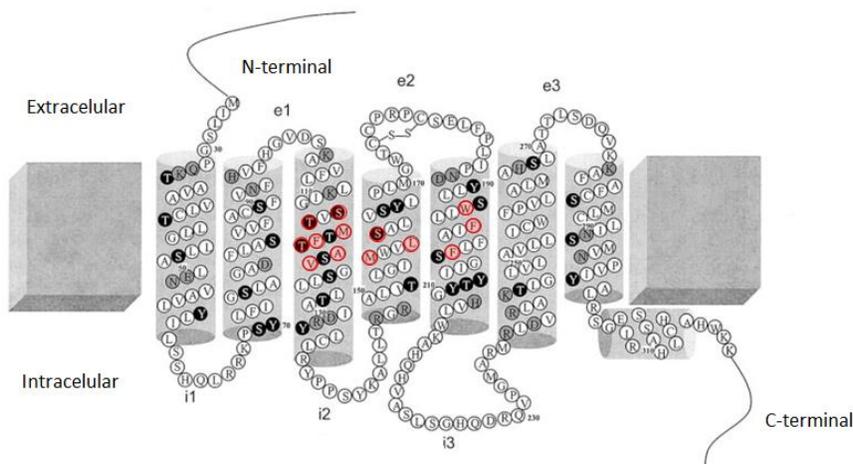


Figura 4. Modelo bidimensional del receptor a cannabinoides tipo 2. El receptor CB2 es un clásico GPCR de siete dominios transmembranales, un extremo N-terminal extracelular y un extremo C-terminal intracelular. Se muestra una probable formación de puente disulfuro entre dos residuos de cisteína del asa dos extracelular. En rojo se muestra a los residuos de aminoácidos que participan en la unión a ligando (Modificado de Xie y cols., 2003).

1.3.3 Nuevos receptores a cannabinoides: GPR55

Además de CB1R y CB2R se han propuesto otros receptores activados por cannabinoides como GPR119 y GPR55 (Sawzdargo y cols., 1999), ionotrópicos como TRPV1 y TRPA1 (Akopian y cols., 2009) y nucleares como PPAR α , el cual controla la transcripción de genes (Sun y cols., 2007). A continuación, mencionaremos algunos aspectos del receptor GPR55 conocido como “el tercer receptor a cannabinoides” (Yang y cols., 2016).

El receptor GPR55 humano (hGPR55) fue aislado en 1999 como un receptor acoplado a proteínas G “huérfano” con una expresión alta en diversos núcleos del SNC (Sawzdargo y cols., 1999) que se localiza tanto en neuronas como en células de la glía (Pietr y cols., 2009). hGPR55 es una proteína de 319 aminoácidos que pertenece a la clase A de los receptores acoplados a proteínas G, muestra un porcentaje de homología del 13.5 % y 14.4 % con el receptor CB1 y CB2, respectivamente. Se han reportado secuencias génicas de GPR55 en ratas, ratones, chimpancés, otros mamíferos y en marsupiales (Baker y cols., 2006), sin embargo, los niveles de RNAm para GPR55 son de 3 a 10 veces menores que los del receptor CB1 dependiendo del núcleo cerebral; se ha identificado en el hipocampo, el cerebelo, la corteza cerebral, el estriado y el núcleo subtalámico (Ryberg y cols., 2007).

En células de la línea HEK-293 transfectadas con GPR55, la anandamida promueve la unión de GTP γ S, activa a RhoA, cdc42 y rac1 a concentraciones nanomolares, estos efectos son mediados por la subunidad G α_{13} (Ryberg y cols., 2007), y en neuronas del ganglio de la raíz dorsal la activación de GPR55 por el Δ^9 -THC aumenta la concentración de calcio en citoplasma a partir de depósitos intracelulares (Lauckner y cols., 2008). Existe evidencia experimental que propone al lisofosfatidilinositol (LPI) como el agonista endógeno de GPR55, este fosfolípido se encuentra en el cerebro a una concentración de 20-40 ng/mg de tejido, aunque inicialmente sólo era considerado como un componente de la membrana plasmática que alteraba sus propiedades mecánicas (Oka y cols., 2009). El LPI consiste de una molécula de glicerol unida a una cadena acil en la posición sn-1 o sn-2 y una molécula mio-inositol en la tercera posición. El fosfatidilinositol es el precursor de las dos formas de LPI: sn-1-lisofosfolípidos o sn-2-lisofosfolípidos, los más representativos y abundantes son el 1-estearil LPI y el 2-araquidonil LPI, respectivamente (Alhouayec y cols., 2018).

A partir del 1-esteoril-2-araquidonil PI y por acción de la PLA2 se genera la hidrólisis del grupo araquidonil en la posición sn-2 para formar el 1-esteoril-LPI; por otra parte, a partir del mismo precursor la enzima PLA1 hidroliza al grupo acil en la posición sn-1 y genera el 2-araquidonil LPI (Grzelczyk y Gendaszewska-Darmach, 2013). Ambos compuestos son transportados al medio extracelular por el transportador dependiente de ATP ABCC1 (Piñeiro y cols., 2011).

En cuanto a su rol fisiológico se le ha relacionado con la modulación de la quimiotaxis en neutrófilos (Balenga y cols., 2011), el crecimiento de las células ganglionares de la retina y la ramificación de sus proyecciones hacia el tálamo (Cherif y cols., 2015). En ratones *knock-out* a GPR55 no se observa hiperalgesia mecánica en los modelos de inflamación crónica y dolor neuropático (Staton y col., 2008); lo cual sugiere su participación en la nocicepción. En el hipocampo de raton la activación del receptor GPR55 promueve la movilización de Ca^{2+} en la presinapsis a partir de compartimentos intracelulares y aumenta la probabilidad de liberación de glutamato en la region CA1 (Sylantsev y cols; 2013).

1.4 El sistema endocanabinoide en los ganglios basales

Entre los múltiples procesos nerobiológicos que regula el sistema de encadocannabinoides se encuentra la modulación de la actividad motora, en general, se ha observado en modelos animales y en humanos que los cannabinoides disminuyen la actividad motora (Fernández-Ruíz y González, 2005), efecto justificado en gran medida por la expresión elevada del receptor a cannabinoides tipo 1 en los ganglios basales, Herkenham y cols. (1991b) observaron la unión abundante del agonista al receptor a cannabinoides [3 H]CP55940 en varias estructuras de los ganglios basales de rata, posteriormente se encontró también en cerebro de humano (Glass y cols., 1997). Además de la expresión del receptor CB1 se ha reportado la presencia de enzimas que sintetizan y degradan a los endocannabinoides en los ganglios basales (Fernández-Ruiz y cols., 2009), y de altos niveles de los endocannabinoides anandamida y 2-AG en globo pálido y SNr (Bisogno y cols., 1999; Di Marzo y cols., 2000).

Los núcleos con mayor expresión de CB1R son la SNr, el globo pálido interno y externo, y el estriado. En general, el receptor CB1 se localiza en las terminales nerviosas de las neuronas espinosas medianas del estriado (MSN) que proyectan a la SNr y al globo pálido (Fusco y cols., 2004), es decir, en las vías directa e indirecta de los ganglios basales. Los agonistas del receptor CB1 disminuyen la liberación de GABA en la SNr, mientras que en el globo pálido estimulan la liberación de GABA, este efecto depende de la activación del receptor a dopamina tipo 2 (D2) (Cilia, 2018).

El receptor CB1 también se expresa en las en las aferentes glutamatérgicas de los ganglios basales, particularmente en las aferentes córtico-estriatales (Kófalvi y cols., 2005) y en las terminales subtálamo-nigrales (Mailleux y Vanderhaeghen, 1992). Hasta la fecha no se ha descrito la expresión del receptor CB1 en neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra pars compacta, pero sí del receptor TRPV1, el cual es activado por la anandamida y modula la liberación de dopamina en las terminales nigro-estriatales (Starowicz y cols., 2007). A pesar de estas evidencias, recientemente se ha propuesto que el receptor CB1 también está presente a nivel post-sináptico en neuronas del globo pálido externo de *Maccaca fascicularis* y forma heterómeros con el receptor CB2 (Sierra y cols., 2015).

Además del receptor CB1, se ha descrito la expresión del receptor CB2 en neuronas del estriado, globo pálido, núcleo subtalámico y SNr (Lanciego y cols., 2011; Sierra y col., 2013; Martínez-Pinilla y cols., 2014; Sánchez-Zavaleta y cols., 2018), aunque su función en estos núcleos ha sido poco estudiada. Se ha observado que el receptor CB2 se expresa también en astrocitos de forma natural, pero en condiciones patológicas asociadas a la neuroinflamación aumenta su expresión en las células de la glía (Sagredo y cols., 2009). La expresión de varios elementos del sistema de endocannabinoides es alterada en trastornos de los ganglios basales, como la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington. En muestras obtenidas de pacientes y en varios modelos experimentales se ha observado que en fases tempranas de las dos patologías hay una desensibilización y regulación negativa del receptor CB1, sin embargo, en las fases intermedia y avanzada existe un aumento en la expresión del receptor CB1 en la enfermedad de Parkinson, mientras que en la enfermedad de Huntington hay una disminución de su expresión, aunque los mecanismos involucrados se desconocen (Fernández-Ruiz y cols., 2009)

1.5 Heterómeros de receptores acoplados a proteínas G

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCR, por sus siglas en inglés) conforman una super familia de proteínas transmembranales que señalizan de forma intracelular. Durante mucho tiempo se creyó que los GPCR funcionaban como entidades monoméricas acopladas a una proteína G heterotrimérica, sin embargo, en las dos últimas décadas ha aumentado la evidencia experimental que sustenta la existencia de GPCRs funcionales como un complejo de dos o más polipéptidos, estudios de cristalografía sugieren que se necesita una relación estequiométrica de GPCRs y proteínas G de 2:1 para que el receptor llegue a su actividad total en presencia de su agonista (Hamm y cols., 2001).

Estudios con el receptor GABA B proponen que las isoformas GABA B(1) y GABA B(2) forman heterómeros de manera constitutiva en el retículo endoplásmico, y que este proceso representa un punto de control crítico para su posterior tráfico vesicular hacia la membrana plasmática (Margeta y cols., 2000). En este contexto, la heterodimerización es un proceso en el cual dos GPCRs de distinta identidad se unen y funcionan como un complejo que tiene un comportamiento diferente al que tiene por separado cada uno de los GPCRs (Ferré y cols., 2009); al respecto, se ha observado que la homodimerización o heterodimerización pueden alterar la permanencia de los GPCRs en la membrana (Canals y cols., 2009), el acople a proteínas G (Jastrzebska y cols., 2006) o promover la señalización o inhibición cruzada (Breit y cols., 2006). Por citar un ejemplo, el receptor D2 de forma convencional se acopla a las proteínas Gi/o, mientras que el receptor A2A a proteínas Gs/olf, sin embargo, como entidad dimérica y tras su co-activación se ha propuesto que se unen a una proteína Gq (Ferré y cols., 2008).

En sistemas de transfección heterólogos y en SNC se ha observado la formación de heterómeros entre receptores a cannabinoides, por ejemplo, el heterodímero CB1-CB2 en el núcleo acumbens de rata (Callén y cols., 2012) y CB1-GPR55 en el estriado de *Macaca fascicularis* (Martínez-Pinilla y cols., 2014) o con otros GPCR como el heterómero CB1-D2 (Kearn y cols., 2005) y CB1-MOR (Hojo y cols., 2008). Sin embargo, se desconoce el rol fisiológico de éstos heterómeros sobre en la transmisión sináptica.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El sistema de endocannabinoides regula múltiples funciones como el desarrollo del sistema nervioso, la excitabilidad neuronal, la neuroinflamación, entre otros procesos (Macarrone y cols., 2014). CB1R se ha considerado como el principal receptor a cannabinoides en el SNC y es el responsable de los efectos psicoactivos del Δ^9 -THC (componente de la marihuana) (Huestis y cols., 2001); sin embargo, estudios recientes sustentan la presencia de otros receptores metabotrópicos a cannabinoides en el SNC como CB2R y GPR55.

A pesar de la controversial presencia de CB2 en neuronas, estudios recientes sugieren que tras su activación disminuye la liberación de glutamato, GABA y dopamina (Bari y cols., 2011; Andó y col., 2009; Xi y cols., 2011). Al respecto, Li y cols. (2017) observaron que CB2R compensa la inhibición en la liberación de GABA mediada por CB1 en la médula dorsal ventromedial; aunado a estas evidencias, en nuestro grupo de trabajo hemos encontrado que la activación de CB2R en la vía subtálamo-nigral disminuye la liberación de glutamato en la SNr de rata. En cuanto al receptor GPR55, tras su activación la concentración de calcio en citoplasma aumenta a partir de reservorios intracelulares de calcio y en el hipocampo incrementa la probabilidad de liberación de glutamato (Henstridge y cols., 2010; Sylantsev y cols., 2013). Ryberg y cols. (2007) han reportado la presencia del RNA mensajero para GPR55 en el estriado, sin embargo, no se sabe si este receptor es enviado por transporte vesicular anterógrado a las aferentes estriato-nigrales y si puede modular la liberación de GABA.

Por otra parte, una característica del receptor CB1 es la formación de heterómeros con otros GPCRs, lo cual resulta en una modificación de la vía de señalización (Kargl y cols., 2012; Martínez-Pinilla y cols., 2014). Tomando como antecedentes la presencia del receptor CB1 en el núcleo subtalámico y el estriado, resulta importante determinar si puede formar heterómeros con el receptor CB2 en la vía subtálamo-nigral y con el receptor GPR55 en las terminales estriato-nigrales, además identificar su probable regulación de la neurotransmisión en el circuito de los ganglios basales.

3. HIPÓTESIS

Los receptores CB2 y GPR55 se expresan en las terminales subtálamo-nigrales y estriato-nigrales donde modulan la liberación de glutamato y GABA, respectivamente y forman dímeros funcionales con el receptor CB1.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión y función de los receptores CB2 y GPR55 en las terminales subtálamo-nigral y estriato-nigral, respectivamente y su probable dimerización con los receptores CB1.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

- I. Completar la caracterización funcional de los receptores CB2 subtálamo-nigrales.
- II. Determinar la presencia del receptor GPR55 en el núcleo estriado y las terminales estriado-nigrales.
- III. Dilucidar la participación de estos dos receptores sobre la neurotransmisión, así como la vía de señalización implicada.
- IV. Determinar la probable formación de heterodímeros CB1-CB2 en terminales subtálamo-nigrales y GPR55-CB1 en proyecciones estriato-nigrales.

6. METODOLOGÍA

6.1 Sujetos de experimentación

En todos los experimentos se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar de 200 a 230 gramos, los animales estuvieron en un ciclo luz-oscuridad de 12h/12h a una temperatura de 22 ± 2 °C, se les proporcionó agua y alimento *ad libitum*. Los animales se mantuvieron de acuerdo a los lineamientos del Comité de Cuidados Animales CINVESTAV-IPN.

6.2 Obtención de las rebanadas de cerebro

Los animales fueron sacrificados de acuerdo con el protocolo establecido por el Comité de Cuidados Animales, se extrajo rápidamente el cerebro y se colocó en solución Krebs-Henseleit (KH) a 4 °C perfundida constantemente con una mezcla de O₂/CO₂ en relación 95:5, v/v. La composición de la solución KH fue la siguiente (mM): NaCl: 118.25; KCl: 1.75; KH₂PO₄: 1.25 y MgSO₄: 1, D-glucosa: 10, NaHCO₃: 25 y CaCl₂: 2; además se agregó ácido aminoxiacético a una concentración final de 200 µM para inhibir a la descarboxilasa de ácido glutámico (Kofalvi y cols., 2005). Posteriormente se realizaron cortes coronales de 300 µm con ayuda de un vibratomo (Campden Inc., Cambridge, UK) y a partir de las rebanadas obtenidas se disecó la SNr (n =10 roedores por cada experimento).

6.3 Liberación de [³H]-GABA y [³H]-glutamato

Para determinar la liberación de [³H]-glutamato se utilizó el protocolo reportado por Cortés y cols. (2010) con ligeras modificaciones; las rebanadas de la SNr se estabilizaron a 37 °C en solución K-H y posteriormente se incubaron en presencia de [³H]-glutamato 100 nM, ácido aminooxiacético [200 µM] para inhibir a la descarboxilasa de ácido glutámico y ácido dihidroxikaínico (DHK) [200 µM] para disminuir la captura de [³H]-glutamato por los astrocitos (Bernardelli y cols., 2008). En la liberación de [³H]-GABA, después de la incubación se agregó ácido nipecótico [10 µM] para inhibir la recaptura de GABA. Posteriormente se depositaron de dos a tres rebanadas en cada cámara de un sistema de perfusión vertical y el tejido fue perfundido con solución K-H a una velocidad de 0.5

□L/min con ayuda de una bomba peristáltica multicanal (Brandel PP120). Se colectaron 4 muestras bajo estas condiciones, para estimular la liberación de [³H]-glutamato la solución de perfusión fue cambiada por solución K-H con una concentración de potasio (K⁺) 30 mM y para el [³H]-GABA la concentración de K⁺ fue de 15 mM, se tomaron 6 colectas más con bajo el estímulo despolarizante. Las drogas se agregaron en la fracción 3 para observar su efecto en condiciones basales, en el caso de los antagonistas CB2 y GPR55 se agregaron desde la fracción 2. La ω-agatoxina TK y ω-conotoxina GVIA se agregaron sólo durante la incubación de las rebanadas de SNr con [³H]-glutamato (30 min).

6.4 Determinación de la radioactividad

La radioactividad se determinó agregando a cada muestra líquido de centelleo con la composición (1 L): tolueno 667 mL, tritón X-100 333 mL, PPO 4 mg y POPOP 200 mg. Se recuperó el tejido de cada cámara y se agregó líquido de centelleo. Posteriormente las muestras se colocaron en el contador de centelleo (Beckman Coulter) y se determinó el número de desintegraciones por minuto. Para normalizar los resultados se obtuvo un cociente de la radioactividad presente en cada fracción entre la radioactividad del tejido.

6.5 Cultivos neuronales primarios

Los cultivos primarios del núcleo subtalámico fueron obtenidos de acuerdo al protocolo reportado por Brewer y Torricelli (2007) para ratas adultas. Se usaron ratas macho con una edad aproximada de 6 semanas, tras su sacrificio se obtuvo el cerebro y se depositó en una solución a 4°C con 220 mM sacarosa, 25 mM NaHCO₃, MgSO₄ 2mM, CaCl₂ 2.5 mM, 10 mM D-glucosa, 2.5 mM KCl y 1.25 mM NaH₂PO₄ (pH 7.4). Se disecó el STN y se incubó con papaína por 30 minutos a 30 °C, se lavó con medio neurobasal (NB-A) y se agregaron 2 mL de medio NB-A para desintegrar el tejido con ayuda de una pipeta siliconizada. Se recuperó el sobrenadante y se repitió el paso anterior. El sobrenadante total se colocó en un gradiente de Lymphoprep y se centrifugó a 100 g por 15 min a 22 °C. Se colectó la fracción neuronal, fue lavada con medio NB-A y finalmente la pastilla se resuspendió en 1 mL de medio NB-A con suplemento B-27, L-glutamina y gentamicina. Las células fueron sembradas en cubreobjetos o en cajas Petri previamente tratados con poli-D-lisina y mantenidas a 37 °C en una atmosfera 5% CO₂/95% aire por 48 horas hasta su uso.

6.6 RT-PCR

Se extrajo el RNA total de riñón, núcleo subtalámico y cultivos primarios por el método de TRIzol (Invitrogen Life Technologies). El RNA fue extraído con cloroformo (Sigma) y se centrifugó a 12,000 g por 15 min a 4°C. La fase acuosa se precipitó con un volumen equivalente de isopropanol y se centrifugó a 10,000 g por 10 min a 4°C. La pastilla se lavó con etanol al 75 % y se resuspendió en agua tratada con dietil pirocarbonato. Se determinó la cantidad de RNA con el espectrofotómetro NanoDrop2000 (Thermo Scientific). El cDNA fue sintetizado a partir de 5 µg de RNA con la transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen) y oligo-dT (50 pmol). Se usaron 3 µl de cDNA para cada reacción de PCR. Las secuencias de los primers usados para la PCR de Cnr2 se determinaron con el programa Perl primer: GAGTTGGGAGGAGACTGCC (*forward*) y CCAGACGAATCAACTTCTTCCC (*reverse*). Los tamaños predecidos de los productos son de 496 pares de bases para la variante 1 (NM_001164143.3) y 2 (NM_001164142.3), y de 353 pb para la variante 3 (NM_020543.4). Las reacciones se realizaron en la siguiente secuencia: un paso inicial a 94°C por 5 min seguido por 42 ciclos (30 s a 94°C, 31 s a 57°C y 30 s a 72°C), finalmente la reacción de extensión se llevó a cabo durante 5 min a 72°C. Los productos de la PCR se visualizaron en gel de agarosa al 2 % con bromuro de etidio y las imágenes se capturaron con ayuda del sistema BioDoc-It (UVP).

6.7 Inmunofluorescencia en tejido y cultivos celulares

Los animales fueron sometidos a una perfusión intracardiaca con PBS (pH = 7.4) y paraformaldehído (PFA) al 4 %, se extrajo el cerebro y se fijó con PFA 4 % durante 24 horas a 4 °C, enseguida fue colocado en una solución de sacarosa al 30 % durante 48 horas a 4 °C y posteriormente se cubrió con el compuesto OCT (Miles Inc., Elkhart, IN, USA) para cortarlo en secciones coronales de 30 µm con ayuda de un microtomo a -25 °C (Leica, Nussloch, Germany). Se obtuvieron rebanadas del núcleo subtalámico, el estriado y la sustancia negra reticulada, las cuales se depositaron en una placa de 24 pozos, donde se procedió a realizar inmunofluorescencia por flotación. Para realizar la recuperación antigénica el tejido se sometió a una temperatura de 95 °C durante tres minutos en presencia de *buffer* de citratos (citrato de sodio: 10 mM, pH: 6.0). Tras el lavado del tejido

con PBS se agregó una solución de albúmina sérica bovina (BSA) al 1% y tritón X-100 al 0.2 % en PBS durante 2 horas para bloquear y permeabilizar al tejido. La incubación con los anticuerpos primarios para SP (1:200), vGLUT2 (1:200), GFAP (1:200), CB1 (1:100), CB2 (1:100) y GPR55 (1:150) se realizó durante 24 horas a temperatura ambiente y para los anticuerpos secundarios correspondientes acoplados a fluoróforo (Alexa 488, Alexa 594 y Alexa 647) 2 horas a temperatura ambiente. (Ver tabla 1 para referencias de anticuerpos).

Para la inmunofluorescencia en cultivos neuronales, las células sembradas en los cubreobjetos se fijaron con PFA al 2 % por 10 minutos, se lavaron dos veces con PBS y se permeabilizaron con 0.12 % de tritón X-100 (Sigma) por 10 minutos. Se realizaron dos lavados más con PBS. Para reducir la unión inespecífica de los anticuerpos primarios, se realizó un bloqueo de 10 minutos con BSA al 10% (Sigma) en PBS, posteriormente los anticuerpos primarios se diluyeron en BSA al 1 % a la respectiva concentración y se incubaron toda la noche a 4 °C. Los cubreobjetos fueron lavados dos veces y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente (Alexa Fluor 488 (1:200) o Alexa Fluor 594 (1:200)) durante dos horas a temperatura ambiente, finalmente se realizaron dos lavados con PBS y se procedió a montar la preparación con medio Vectashield/DAPI (Sigma).

6.8 Ensayo de proximidad de ligando (PLA)

En el protocolo de PLA las rebanadas y los portaobjetos tuvieron un tratamiento similar al previamente descrito hasta la incubación con los anticuerpos primarios, posteriormente se incubaron con los anticuerpos secundarios acoplados a sondas de ADN complementarias: anti-*rabbit* (-) y anti-*goat* (+) (DuoLink II) durante 1 hora, se agregó la solución de ligación y la ligasa (1:40) durante una hora para promover la hibridación de las sondas, enseguida se colocó la solución de amplificación y la polimerasa (1:80) durante 90 minutos para obtener un concatémero por replicación en círculo rodante, finalmente se añadieron oligonucleótidos acoplados a un fluoróforo y complementarios al producto de la amplificación durante 90 minutos; todas las reacciones se efectuaron a una temperatura de 37°C. El tejido se montó en medio Vectashield con DAPI (Sigma) y las laminillas fueron analizadas en el microscopio confocal Leica SP8.

6.9 Lesión del STN y Estriado

Se lesionaron diferentes lotes de roedores de forma unilateral con ácido kaínico (1 $\mu\text{g}/0.5$ μL) en el STN o con dos administraciones de KA (1 $\mu\text{g}/1$ μL) con base en los protocolos establecidos por Rosales y cols. (1997) y Acosta-García y cols. (2009). Después de ser anesteciados, los animales se colocaron en el aparato estereotáxico, enseguida se realizó un trépano y se posicionó una microaguja (0.22 mm x 1.4 mm) en el STN derecho, de acuerdo con las coordenadas del atlas de Paxinos y Watson (1998) AP: -3.8, L: -2.2 con respecto a bregma y P: -8.0 con respecto a dura. Las coordenadas para el estriado fueron: AP: 1.9, L:-2.2, P:-5, y AP: 0.9, L:-3.0, P:-4.0. Con ayuda de una bomba de infusión se administró 0.5 μL de ácido kaínico a una velocidad de flujo de 0.1 $\mu\text{L}/2$ min. Después de la cirugía, los sujetos de experimentación recibieron cuidados post-operatorios y se les administró penicilina procaínica (5 UI) durante tres días. Quince días después de la lesión los animales se sacrificaron y se disecó por separado la SNr del lado intacto y del lado lesionado.

6.10 Obtención de sinaptosomas

Las rebanadas de la SNr fueron homogeneizadas en 3 mL de solución HEPES-sacarosa 0.32 M a pH 7.4 aplicando 10 golpes a 450 rpm cada uno, posteriormente se centrifugó a 800g a 4°C por 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 20000g durante 20 min a 4 °C. El precipitado obtenido (fracción sinaptosomal cruda) se resuspendió en 1 mL de solución HEPES-sacarosa 0.32 M y se colocó sobre 5 mL de una solución de sacarosa 0.8 M para formar un gradiente de concentración; finalmente se realizó una última centrifugación a 20000 g durante 20 minutos.

6.11 Western blot

Se cargaron 50 µg de proteína de cada muestra de interés en los geles desnaturalizantes preparados al 12% de acrilamida (SDS-PAGE); la electroforesis se realizó a 100 V durante 90 minutos y la transferencia se realizó en membranas de PVDF por 2 horas a 4°C con amperaje constante de 250 mA. Enseguida la membrana se bloqueó con una solución de leche al 5% libre de grasa en PBS por 2 horas. Posteriormente se incubó con los anticuerpos primarios respectivos (Ver tabla 1) por 24 horas y el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a peroxidasa durante 2 horas. Las bandas de interés fueron reveladas en una placa foto-sensible mediante la quimioluminiscencia producida por una solución de luminol Pierce ECL Plus®. Se realizó un análisis densitométrico de las bandas obtenidas con el programa ImageJ.

6.12 Co-inmunoprecipitación

A partir de los sinaptosomas obtenidos de la SNr, se tomaron 500 µg de proteína y se agregó 20 uL de perlas de agarosa A/G (Sigma), esta mezcla se dejó en agitación durante 12 horas a 4 °C. Enseguida se agregó el anticuerpo para el receptor CB2 a una concentración final de 1:200 y se dejó en agitación rotatoria por 2 horas, después de esto se separaron las perlas del sobrenadante por centrifugación a 10000 RPM durante 15 segundos, se realizó el lavado de las perlas con buffer de equilibrio, para posteriormente agregar buffer de muestra y desnaturalizar a las proteínas. Las muestras fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida y posteriormente la proteína fue transferida a una membrana de PVDF para determinar la presencia de la proteína de interés con el uso de anticuerpos específicos para cada receptor.

6.13 Drogas y Anticuerpos

Droga	Concentración	Distribuidor	Función
Clorhidrato de 2-[(3-clorofenil)amino]-n-(4-piridinilmetil)-4-(trifluorometil)-5-pirimidinacarboxamida, GW833972A	100 nM	Sigma-Aldrich	Agonista CB2
1-(2,3-Diclorobenzoil)-5-metoxi-2-metil-(3-(morfolin-4-yl)etil)-1H-indol clorhidrato (GW405833)	10 ⁻¹⁰ - 10 ⁻⁵ M	Sigma-Aldrich	Agonista CB2
3-(1,1-Dimetilbutil)-1-deoxi-Δ8-tetrahidrocanabinol (JWH-133)	10 ⁻¹⁰ - 10 ⁻⁵ M	Sigma-Aldrich	Agonista CB2
N-(1,3-benzodioxol-5-ilmetil) - 1,2-dihidro-7-metoxi-2-oxo-8-(pentiloxi)-3-quinolincarboxamida, JTE-907	10 nM	Sigma-Aldrich	Agonista inverso/Antagonista CB2
6-Iodo-2-metil-1-[2-(4-morfolinil)etil]-1H-indol-3-yl](4-metoxifenil)metanona AM630	200 nM	Abcam	Agonista inverso/Antagonista CB2
Toxina pertussis	10 µg/1 µL	Sigma-Aldrich	Inhibidor de proteínas Ga _{i/o}
4,5-Dihidroxi fluoresceína (Galeína)	10 µM	Sigma-Aldrich	Inhibidor del complejo Gβ/γ
Forskolina	10 µM	Sigma-Aldrich	Activador de la AC
Diclorhidrato de N-[2-(p-Bromocinnamilamino)etil]-5-isoquinolinsulfonamida H-89	10 µM	Sigma-Aldrich	Inhibidor de la PKA
ω-Conotoxina GVIA	1 µM	Alomone labs	Bloqueador de los canales de Ca ²⁺ tipo N
ω-Agatoxina TK	1 µM	Alomone labs	Bloqueador de los canales de Ca ²⁺ tipo P/Q
1,4-Dihidro-2,6-dimetil-4-(2-nitrofenil)-3,5-ácido piridincarboxílico dimetil ester (Nifedipino)	10 µM	Sigma-Aldrich	Bloqueador de los canales de Ca ²⁺ tipo L

Ácido kaínico	1 mg/0.5 mL	Sigma-Aldrich	Neurotoxina
L- α -Lisofostatidilinositol (LPI)	100 nM	Sigma-Aldrich	Agonista de GPR55
5-metil-4-[(1R,6R)-3-metil-6-(1-metiletetil)-2-ciclohexeno-1-yl]-1,3-bencendiol (O-1602)	100 nM	Tocris	Agonista de GPR55
2-[(1R,6R)-3-Metil-6-(1-metiletetil)-2-ciclohexeno-1-il]-5-pentil-1,3-bencenodiol (Cannabidiol)	200 nM	Tocris	Antagonista de GPR55
4-[4,6-Dihidro-4-(3-hidroxifenil)-3-(4-metilfenil)-6-oxopirolo[3,4-c]pirazol-5(1H)-yl]-ácido benzóico (CID16020046)	400 nM	Sigma-Aldrich	Antagonista de GPR55
1-[6-[(17 β)-3-Metoxiestra-1,3,5[10]-trieno-17-il)amino]hexil]-1H-pirrol-2,5-diona (U-73122)	10 μ M	Tocris	Inhibidor de la PLC
Ácido etilendiamintetraacético (EDTA)	5 mM	Sigma-Aldrich	Quelante de Ca ²⁺
2-[[[(3S,3aR,4S,6S,6AR,7S,8S,9bS)-6-(Acetiloxi)-2,3,3a,4,5,6,6a,7,8,9b-decahidro-3,3a-dihidroxi-3,6,9-trimetil-8-[(2Z)-2-metil-1-oxo-2-butenil]oxi]-2-oxo-4-(1-oxobutoxi)azuleno[4,5-b]furan-7-il octanato (Tapsigargina)	2 μ M	Tocris	Inhibidor de SERCA ATPasa
8-Bromoadenosina-3',5'-monofosfato cíclico de sodio (8-Br-AMPe)	250 μ M	Sigma-Aldrich	Activador de la PKA
2-Amino-7-(furanil)-7,8-dihidro-5(6H)-quinazolina (NKY80)	10 μ M	Tocris	Inhibidor de la AC 5/6
Toxina colérica	1 μ g/mL	Merck Mollipore	Activador de las proteínas G $\alpha_{s/olf}$

Anticuerpos primarios	Dilución		Distribuidor
	Western blot	Inmunofluorescencia	
Anti-CB2	1:1000	1:100	Alomone lab
Anti-CB1	1:2000	1:100	Antibodies online
Anti-GPR55	1:1500	1:100	Bioss
Anti-vGLUT2	-	1:200	abcam
Anti-GFAP	-	1:200	Santa Cruz
Anti-SP	-	1:200	abcam
Anti-D4	-	1:100	Santa Cruz
Anti-actina	1:2500		
Anticuerpos secundarios			
HRP anti-rabbit	1:2000	-	abcam
HRP anti-goat	1:2500	-	Santa Cruz
HRP anti-mouse	1:2500	-	abcam
Alexa 488 anti-rabbit	-	1:100	abcam
Alexa 594 anti-mouse	-	1:100	abcam
Alexa 647 anti-goat	-	1:100	abcam

Kit PLA:

Duolink® In Situ Red Starter Kit Goat(+)/Rabbit(-)

7. RESULTADOS

7.1 La proteína y el RNA mensajero para el receptor CB2 se expresan en neuronas del núcleo subtalámico de rata

En experimentos realizados durante la Maestría observamos que el receptor CB2 se localiza en las terminales subtálamo-nigrales y que el agonista GW833972A [100 nM] disminuye la liberación de [³H]-glutamato de forma independiente de la vía AC-AMPC-PKA. La presencia de CB2R en neuronas del SNC ha sido controversial (Mechoulam y Parker, 2013), por tal motivo el primer objetivo en éste trabajo fue identificar si el receptor CB2 se expresa en neuronas de proyección del STN, para ello utilizamos un anticuerpo contra el receptor CB2 probado en ratones knock-out (Zhang y cols., 2014) y otro contra el transportador vesicular de glutamato tipo 2 (vGLUT2) como un marcador del fenotipo neuronal glutamatérgico (Hrabovszky y cols., 2006). Tanto en cortes coronales del subtálamo (Figs. 1A-B), como en los cultivos neuronales primarios del STN de ratas adultas (3-4 semanas) (Fig. 1C) hay co-localización de CB2R (verde) con vGLUT2 (rojo) (B4 y C4), lo cual sugiere que CB2R se expresa en neuronas glutamatérgicas.

Después de determinar la expresión de la proteína evaluamos la presencia del RNA mensajero para CB2 por RT-PCR en tejido y cultivos neuronales primarios del STN. La probable contaminación de los cultivos neuronales con astrocitos se determinó usando un anticuerpo contra GFAP y se encontró una célula en 7 campos ópticos, es decir que existe una mínima contaminación (Anexo 2). Para determinar el RNAm para CB2 por RT-PCR se empleó un par de primers diseñados con base en una secuencia conservada entre las variantes transcripcionales 1 (NM_001164143.3), 2 (NM_001164142.3) y 3 (NM_020543.4). En las muestras de bazo (usado como control positivo), de STN y en cultivos primarios neuronales del STN se observa un amplicon de aproximadamente 496 pares de bases correspondiente a la predicción para las isoformas 1 y 2; de forma interesante la banda de 353 pares de bases correspondiente a la variante transcripcional 3 sólo se detectó en el bazo (Fig. 2). El producto de la amplificación fue enviado a secuenciar al Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y se realizó un blast para validar la especificidad de los primers (Anexo 1).

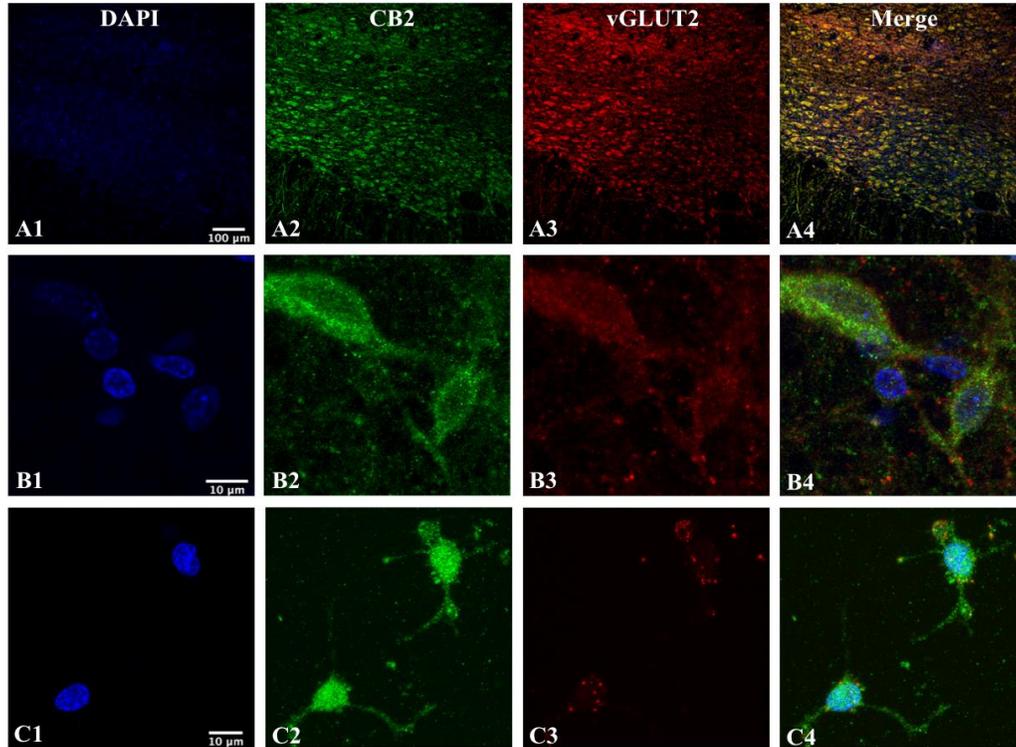


Figura 1. Expresión del receptor CB2 en tejido y cultivos neuronales del subtálamo. Fotomicrografías representativas obtenidas por inmunofluorescencia de células positivas al receptor CB2 en rebanadas del subtálamo de rata (A y B) y neuronas aisladas de éste núcleo (C). En azul se observa la tinción de núcleos celulares con DAPI (A1, B1 y C1), el verde representa la marca positiva para el receptor a cannabinoides tipo 2 (A2, B2 y C2) y en rojo la presencia del transportador vesicular de glutamato tipo 2 (rojo, A3, B3 y C3). Existe co-localización de CB2 con vGLUT (A4-C4). Barra de escala superior: 100 µm, media e inferior: 10 µm.

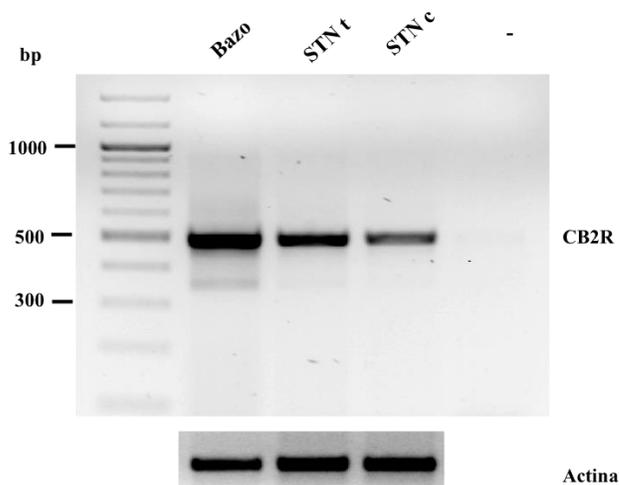


Figura 2. El RNA mensajero para CB2R se localiza en neuronas del subtálamo. El RNA total fue aislado del bazo (control positivo), núcleo subtalámico y cultivos de STN. La RT-PCR fue llevada a cabo usando *primers* para el receptor CB2. El tamaño del amplicon esperado es de 496 pares de bases y corresponde a las isoformas 1 y 2. En el bazo se expresa la variante transcripcional 3 (353 pb). En el último carril se muestra el control negativo.

7.2 La activación de CB2R disminuye la liberación de [³H]-Glutamato en la SNr de rata a través del complejo β/γ y por la inhibición de los canales de calcio tipo P/Q

Los resultados de inmunofluorescencia y RT-PCR sugieren que CB2R se localiza en neuronas del subtálamo y sustentan resultados previos acerca de la presencia de CB2R en terminales glutamatérgicas que inervan a la SNr, núcleo en el cual previamente evaluamos el efecto de la activación de CB2R sobre la liberación de [³H]-Glutamato con el agonista GW833972A, para completar estos estudios determinamos el efecto de otros dos agonistas: JWH-133 (Huffman y cols., 1999) y GW405833 (Gallant y cols., 1996). En la figura 3 se observa que los 3 agonistas disminuyen la liberación de [³H]Glutamato inducido por K⁺ de forma concentración-dependiente, sin embargo, el más eficaz fue el GW833972A (IC₅₀ = 126 nM, intervalo de confianza (InC): 65-246 nM e inhibición máxima del 66 ± 5 %). Los efectos de GW405933 y JHW133 fueron menos efectivos, pero significativos (GW405833: IC₅₀ = 36 nM, InC: 2-611 nM, inhibición máxima = 31 ± 7%; JWH133 IC₅₀ = 49 nM, InC: 2-610 nM, inhibición máxima: 24 ± 8%).

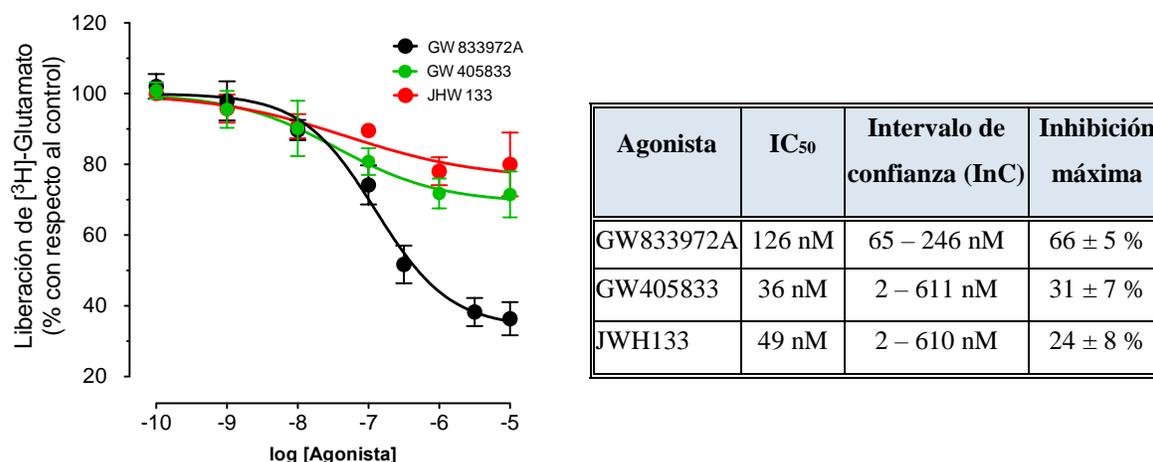


Figura 3. La activación del receptor CB2 disminuye la liberación de [³H]-glutamato en rebanadas de la SNr de rata. A) Curva dosis-respuesta de la liberación de [³H]-glutamato. En el eje de las ordenadas se representa el % de la liberación con respecto al control, en el eje de las abscisas se muestra la concentración de los agonistas a CB2R: GW833972A, GW405833 y JWH133. **B)** Valores de IC₅₀, InC e inhibición máxima de los agonistas. El GW833972A es el agonista más eficaz con una IC₅₀=126 nM, InC: 2-611 nM y una inhibición máxima del 66±5%. Los datos son graficados como la media ± el error estándar de 3 experimentos con 4 réplicas cada uno.

Posteriormente continuamos con la caracterización de la vía de señalización por la cual CB2R disminuye la liberación de [³H]glutamato; 48 horas antes de los experimentos de liberación se administró toxina pertussis (PTX, 10 µg/µL) de forma unilateral en la SNr, la cual previene la activación de proteínas Gα_i (Innis y Aghajanian, 1987); en el lado contralateral se inyectó solución salina isotónica como vehículo de la toxina, donde se observa que el GW833972A [100 nM] disminuyó 48 % de la liberación de [³H]glutamato (GW833972A: 52 ± 2%, t = 47.24, df = 2, p <0.001 con respecto al control, t de Student test, n = 3 experimentos, 5 replicas cada uno), éste efecto fue prevenido por la PTX (Fig. 4A y 4B). Por otra parte, la galeina [10 µM], un inhibidor del complejo β/γ (Lin y Smrcka, 2011) también previno la inhibición en la liberación mediada por el agonista CB2 (Porcentaje con respecto al control, GW833972A = 63 ± 3% vs. GW833972A+ galeina = 105 ± 6 %, diferencia significativa (ds) = 41.9, p <0.01, F = 28.29, df = 3, ANOVA de una vía y Tukey post-test, n = 3 experimentos, 5 replicas por experimento) (Fig. 1C). (Fig. 4).

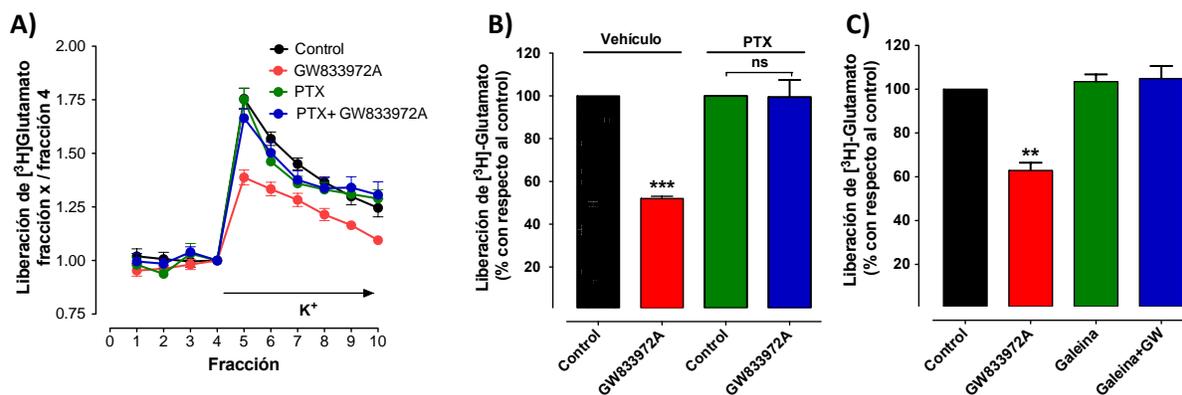


Figura 4. El complejo β/γ participa en la inhibición de la liberación de [³H]-Glutamato inducida por GW833972A. A) Curso temporal de la liberación de [³H]-Glutamato inducida por K⁺ 30 mM (flecha negra) en rebanadas de SNr después de 48 horas de la inyección unilateral de PTX (10 µg/µL) y contralateral de SSI en la SNr. **B)** Área bajo la curva de A graficada como porcentaje con respecto al control. En ratas tratadas con vehículo el GW833972A [100 nM] disminuye la liberación de glutamato 48 % (**p<0.001 con respecto al control, t de Student test, n=3), éste efecto se previene por la pre-administración de PTX. **C)** La galeina [10 µM] previene la inhibición de la liberación de [³H]-Glutamato por el GW833972A (GW833972A+Galeina: 105±6 %) **p <0.01, F=28.29, df=3, ANOVA y Tukey post-test, n=3 experimentos, 5 replicas por cada uno.

Se ha reportado que el receptor CB2 inhibe los canales de calcio activados por voltaje en cultivos autópticos de neuronas del hipocampo (Atwood y cols., 2012), debido a ello evaluamos si el efecto inhibitorio de CB2R sobre la neurotransmisión glutamatérgica en nuestro modelo depende de éstos canales, se emplearon bloqueadores específicos para tres subtipos. La pre-incubación de las rebanadas de SNr durante 30 minutos con la ω -conotoxina GVIA 1 μ M (bloqueador de canales de calcio tipo N, Hirata y cols., 1997) generó una modesta pero significativa disminución en la liberación de [³H]-glutamato del 18.38 ± 3.32 %, este efecto es aditivo a la disminución generada por el GW833972A, el cual fue de 47.66 ± 0.92 %, pero en presencia de ambos compuestos la inhibición fue de 64.16 ± 4.18 % (porcentaje de liberación con respecto al control, GW833972A: 52 ± 2 %, ω -conotoxina GVIA: 81 ± 6 % y GW833972A+ ω -conotoxina GVIA: 36 ± 4 %; Diferencias estadísticas: ω -conotoxina GIVA vs. control, diferencia significativa (ds) = 18.38, $p < 0.01$; GW833972A vs. control, ds = 47.6, $p < 0.001$; GW833972A + ω -Con-GVIA vs. control, ds = 64.16, $p < 0.001$; GW833972A + ω -Con-GVIA vs. GW83393A, ds = 16.5, $p < 0.01$; F = 112.6, df = 3, ANOVA y Tukey post-test , n = 3 experimentos, 5 replicas por experimento).

La participación de los canales de calcio tipo P/Q fue evaluada al bloquearlos con la ω -Agatoxina TK a 1 μ M (Terramoto y cols., 1995), el pretratamiento con la toxina redujo la liberación en un 50.51 ± 4.73 % y tuvo efectos oclusivos con el agonista CB2, es decir no se observó efecto del agonista GW833972A cuando los canales P/Q se bloquearon (liberación de [³H]glutamato con respecto al control, GW833972A: 52 ± 3 %; ω -Agatoxina-TK: 49 ± 5 %, y GW833972A+ ω -Agatoxina-TK: 45 ± 5 %; diferencias estadísticas: ω -Agatoxina-TK vs. control, ds = 50.5, $p < 0.001$; GW833972A vs. control, ds = 48.2, $p < 0.001$; GW833972A + ω -Agatoxina-TK vs. control, ds = 55.4, $p < 0.001$; GW833972A + ω -Agatoxina-TK vs. GW83393A y vs. ω -Agatoxina-TK; sin diferencia significativa (ns); F = 49.03, df = 3, ANOVA de una vía y Tukey post-test, n = 3 experimentos, 5 réplicas por experimento).

Finalmente, el bloqueador de canales de calcio tipo L (nifedipino) a una concentración de 10 μ M (Meir y cols., 1999) no modificó la liberación de [3 H]-glutamato ni el efecto inhibitor inducido por el GW833972A (Liberación de [3 H]-glutamato con respecto al control, GW833972A: $62 \pm 4\%$, nifedipino: $97 \pm 3\%$, GW833972A + nifedipino: $69 \pm 5\%$; diferencias estadísticas: nifedipino vs. control, $ds = 2.7$, sin significancia (ns); GW833972A vs. control, $ds = 37.5$, $p < 0.001$; GW833972A+nifedipino vs. control, $ds = 30.9$, $p < 0.01$; GW833972A + nifedipino vs. GW83393A, $ds = -6.6$, ns, ns; $F = 31.01$, $df = 3$, ANOVA de una vía y Tukey post-test, $n = 3$ experimentos, 5 replicas por experimento) (Fig. 5).

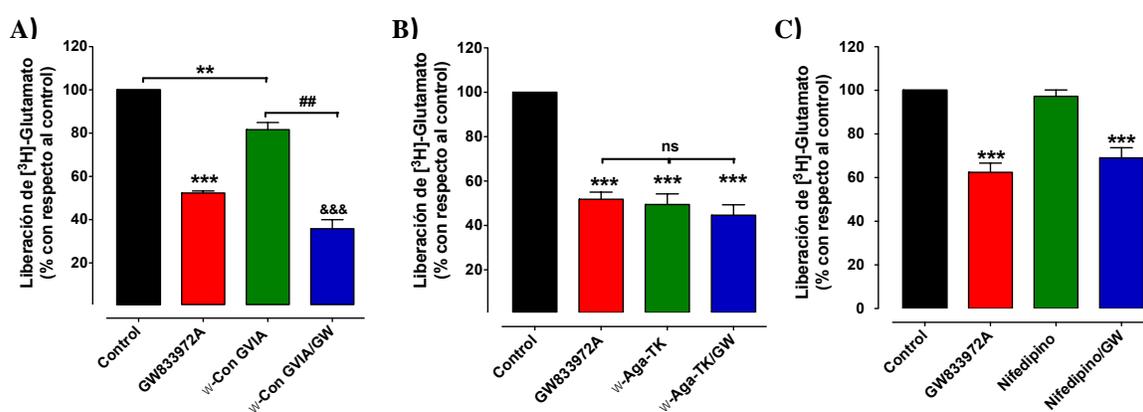


Figura 5. El bloqueo de los canales de Ca^{2+} tipo P/Q previene la disminución en la liberación de [3 H-Glutamato] inducida por el GW833972A. Efecto de los bloqueadores de los canales de calcio tipo **A)** N (ω -Conotoxina GVIA), **B)** P/Q (ω -Agatoxina TK) y **C)** L (Nifedipino) sobre la liberación de [3 H]-Glutamato en la SNr. La ω -Conotoxina GVIA disminuye la liberación de [3 H]-Glutamato y al agregar GW833972A se presenta un efecto aditivo sobre la liberación, la ω -Agatoxina TK disminuye la liberación y previene el efecto del GW833972A, el Nifedipino no tiene efecto sobre la liberación. Se representa la media aritmética \pm ESM de 3 experimentos independientes con 4 réplicas en cada uno. ANOVA de una vía y Tukey post-test, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ con respecto al control; ### $p < 0.01$ con respecto a GW833972A; &&& $p < 0.001$ con respecto a ω -Conotoxina GVIA.

7.3 El receptor CB1 forma heterómeros con el receptor CB2 en el subtálamo y en terminales subtálamo-nigrales

En sistemas de transfección heterólogos, en el núcleo accumbens y en el globo pálido de rata se ha observado la formación del heterómero CB1-CB2 (Callén y cols., 2012), después de haber demostrado la expresión y función del receptor CB2 en las terminales subtálamo-nigrales nos cuestionamos si podría formar heterómeros con el receptor CB1 en el subtalamo y en las proyecciones que envía a la SNr, puesto que existe evidencia de la expresión de CB1R en las terminales subtálamo-nigrales (Wallmishrath y Szabo, 1991). Para tal objetivo realizamos ensayos de proximidad de ligando (PLA) con ayuda del kit DuoLink-II, el cual nos permite determinar la interacción proteínas en sistemas nativos con una sensibilidad menor a 40 nm (Debaize y cols., 2017) (Fig. 6A). En rebanadas coronales del STN de rata se observó la presencia del heterómero CB1-CB2 representado en un patrón de puntos rojos en torno a núcleos celulares marcados con DAPI (azul) (6C y 6D). En ausencia de anticuerpos primarios para CB1 y CB2 se encontró un marcaje escaso para el heterómero (6B).

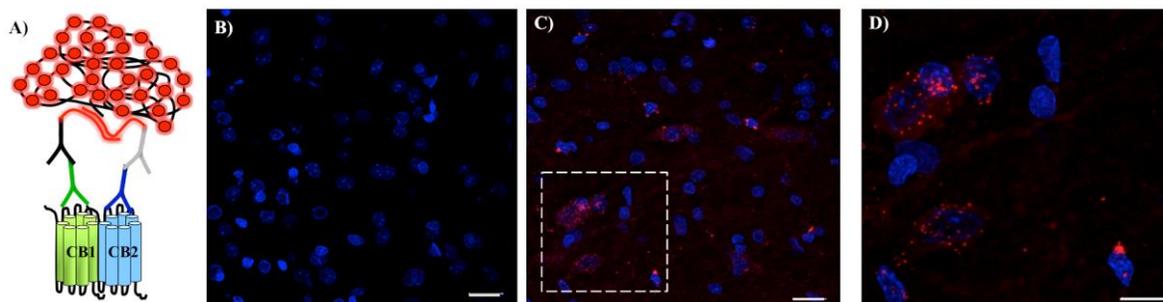


Figura 6. El heterómero CB1-CB2 se expresa en el núcleo subtalámico de rata. A) Representación esquemática del ensayo de proximidad de ligando (PLA) para CB1 y CB2 (Ver metodología). Fotomicrografías representativas de PLA en **B)** ausencia o **C)** presencia de los anticuerpos para CB1 y CB2 en rebanadas coronales del subtálamo. Los puntos rojos (Texas Red) indican la presencia del heterómero CB1-CB2. En azul se representan los núcleos celulares teñidos con DAPI. Barra de escala 20 μ m. En **D)** se observa una magnificación de C, obsérvese la expresión de los heterómeros entorno a los nucleos marcados con DAPI (azul). Barra de escala: 10 μ m.

Con el mismo ensayo evaluamos la expresión del heterómero CB1-CB2 en la SNr, uno de los núcleos inervados por el subtálamo. Con ayuda del programa Fiji y siguiendo el protocolo establecido por Bonaventura y cols. (2014) contamos el número de puntos rojos (indicativo del número de heterómeros CB1-CB2) en rebanadas de la SNr 15 días después de la lesión unilateral del subtálamo con ácido kaínico (1 $\mu\text{g}/0.5 \mu\text{L}$). En el lado intacto se encontró un promedio de 281.6 ± 31.4 puntos por campo óptico (7 B), mientras que en el lado lesionado hay una disminución significativa a 146.8 ± 24.2 ($t=11.42$, $df=4$, $p<0.05$, t de Student test, $n= 6-7$ campos ópticos) (7C). Aunado a éste resultado, en el ensayo de co-immunoprecipitación en sinaptosomas de la SNr observamos que después de inmunoprecipitar al receptor CB2 con un anticuerpo específico y realizar un western blot para el receptor CB1 obtuvimos una banda de aproximadamente 50 kDa (que corresponde a su peso molecular esperado) en los sinaptosomas totales (In), en el inmunoprecipitado (IP) y en el sobrenadante (S). En el control negativo (-) se omitió al anticuerpo para CB2 en el inmunoprecipitado.

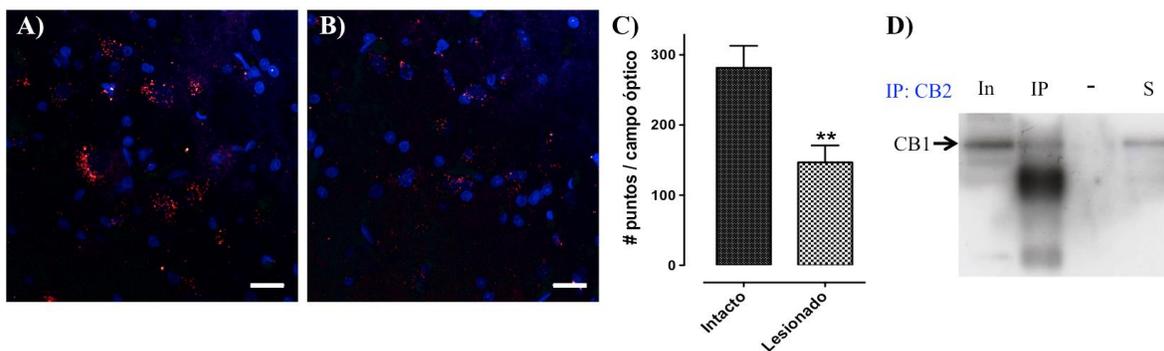


Figura 7. Expresión del heterómero CB1-CB2 en las terminales subtálamo-nigrales. Fotomicrografías obtenidas por microscopia confocal después del ensayo de PLA en rebandas de la SNr intacta (A) y tras la lesión con ácido kaínico del subtálamo (B) en presencia de los anticuerpos primarios para CB1 y CB2. Los puntos rojos (Texas Red) indican la localización del heterómero CB1-CB2. En azul se muestran los núcleos marcados con DAPI. Barra de escala: 20 μm . C) Cuento automático del número de puntos de A y B. Intacto: 281.6 ± 31.4 puntos, lesionado: 146.8 ± 24.2 ($t=11.42$, $df=4$, $**p<0.05$, t test, $n= 6-7$ campos ópticos por cada condición). D) Blot para el receptor CB1 después de inmunoprecipitar a CB2r en sinaptosomas de la SNr. Se observa una banda de 50 kDa esperada para el receptor CB1. In: Sinaptosomas totales, IP: Inmunoprecipitado, -: Control negativo y S: Sobrenadante.

7.4 El receptor GPR55 se localiza en la vía directa de los ganglios basales

Por medio de RT-PCR e hibridación *in situ* se ha determinado la expresión del RNAm y recientemente de la proteína para el receptor GPR55 en el núcleo estriado de rata (Ryberg y cols., 2007; Celorrio y cols., 2017); el primer abordaje experimental que realizamos fue evaluar su expresión por inmunofluorescencia en la vía directa de los ganglios basales, para ello utilizamos un anticuerpo específico contra la sustancia P, un péptido utilizado como marcador de las neuronas espinosas medianas (MSN) de la vía directa (Gerfen y Bolam, 2010). En la figura 8 se observa inmunomarcaje para GPR55 (verde, Alexa 488) y su co-localización con neuronas positivas a sustancia P (rojo, Alexa 594) indicada por flechas, esta evidencia experimental sustenta la idea de que GPR55 se localiza en el soma de las MSNs de la vía directa. Es importante notar que existen algunos elementos positivos a GPR55 que no co-localizan con SP (Fig. 8).

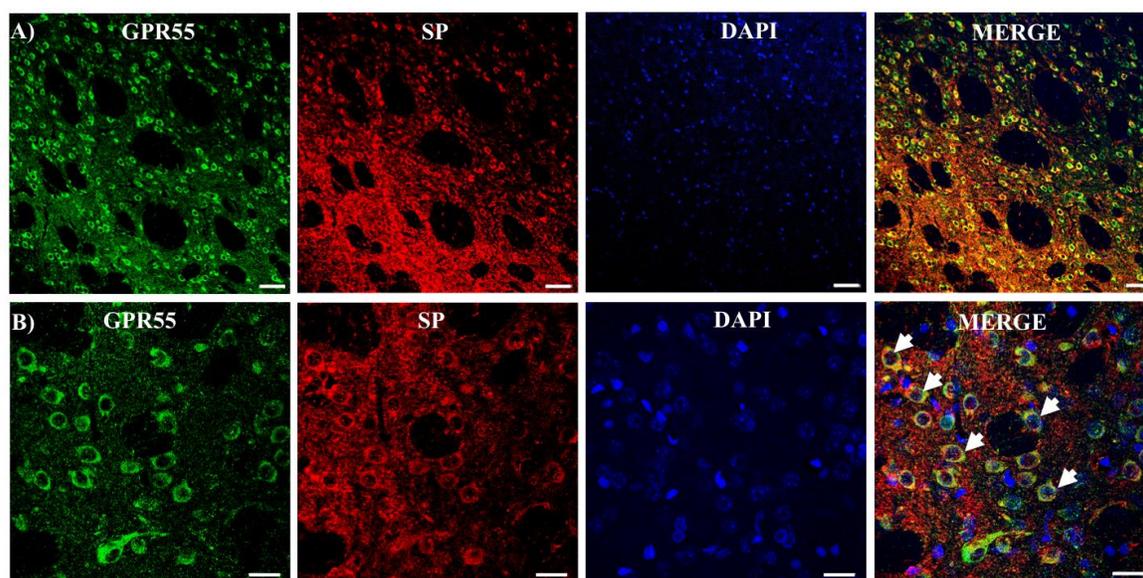


Figura 8. Expresión del receptor GPR55 en el estriado dorso-lateral de la rata. A) Imágenes representativas obtenidas por microscopia confocal en presencia de los anticuerpos para GPR55 y sustancia P en rebanadas del núcleo estriado de rata. La marca en verde (Alexa 488) muestra la expresión de GPR55 en torno a nucleos celulares teñidos con DAPI y su co-expresión con sustancia P (rojo, Alexa 594). B) Ampliación de A, las flechas indican neuronas positivas a GPR55 y SP. Barra de escala superior: 100 μ m, inferior: 20 μ m.

El receptor CB1 se sintetiza en el estriado y se envía a las terminales que inervan a la SNr (Herkenham, 1991b); aquí evaluamos si GPR55 también se expresa en la vía estriato-nigral. En la Fig. 9A observamos marcaje positivo para éste receptor en la SNr (verde). Por otra parte, al determinar su presencia en sinaptosomas de la SNr observamos una banda de aproximadamente 37 kDa correspondiente al peso esperado para GPR55, después de la lesión del estriado con ácido kaínico (1µg/µL) la expresión de GPR55 disminuye con respecto al lado intacto. Se obtuvo un cociente de la densidad óptica de GPR55 entre la actina y se observa que en el lado lesionado GPR55 disminuye a 49.3 ± 3.2 % con respecto al lado intacto ($t=15.4$, $df=2$, $p<0.05$, t de Student test, $n=4$ por cada condición) (Fig. 9C).

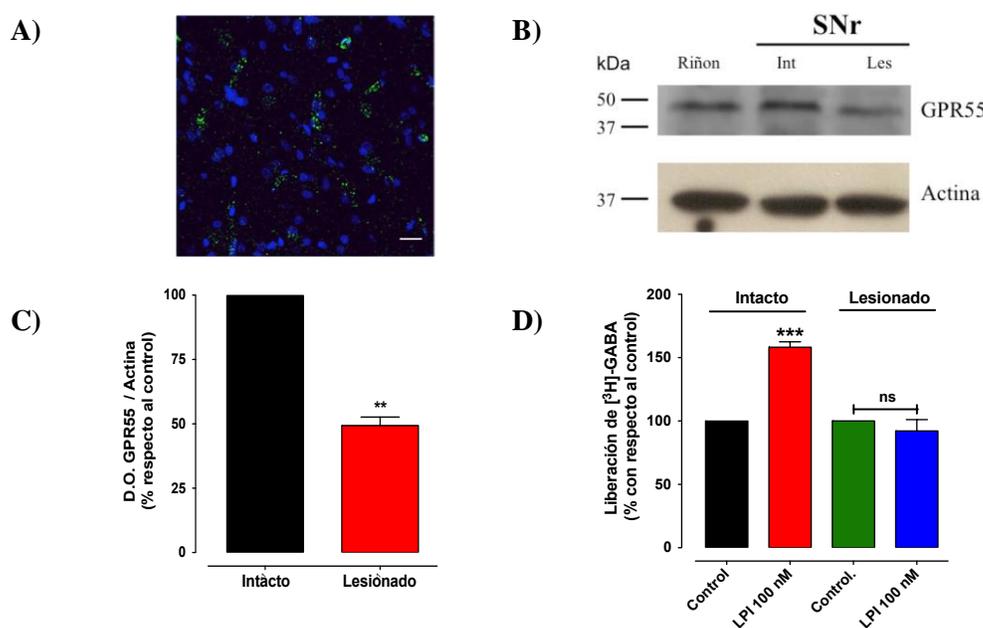


Figura 9. El receptor GPR55 se expresa en las terminales estriato-nigrales. **A)** Fotomicrografía de la SNr de rata donde se observa inmunorreactividad para GPR55 (verde). **B)** Inmunoblot representativo que muestra una banda de aproximadamente 37 kDa correspondiente al peso reportado para GPR55, en el primer carril se visualiza al riñón como control positivo; la lesión del estriado dorso-lateral con ácido kaínico disminuye la expresión de GPR55 en sinaptosomas de la SNr con respecto al lado intacto. **C)** Promedio de la densidad óptica GPR55/Actina graficada como porcentaje con respecto al lado intacto, $**p<0.05$, t de student test de muestras independientes, $n=4$ por condición. **D)** Liberación de [³H]GABA en rebanadas de la SNr, la lesión con KA previene el aumento en la liberación de [³H]GABA inducido por el LPI. Se graficó la media aritmética \pm ESM de 3 experimentos y 5 replicas en cada uno. $***p < 0.001$ con respecto al grupo control, ns = sin diferencia significativa, t de Student test para muestras independientes.

Por otra parte, al cuantificar la liberación de [³H]GABA en las rebandas de SNr donde se administró SSI en el estriado, el LPI estimula la liberación de GABA (LPI: 158.2 ± 4.26 %, t=13.65 df=6, p <0.001 con respecto al control, t de Student test, n = 4 experimentos, 4 replicas cada uno), mientras que la administración de KA en el estriado previene el aumento en la liberación de GABA inducido por el LPI en la SNr (LPI: 92.1 ± 8.8 %, t=0.8760 df=4, sin diferencia significativa, n = 4 experimentos, 4 replicas cada uno). Estos resultados sustentan la hipótesis de que GPR55 se localiza en la vía estriato-nigral (Fig. 9D).

7.5 La activación de GPR55 aumenta la liberación de [³H]GABA en rebandas de la SNr

Después de determinar la expresión de GPR55 en las terminales estriato-nigrales evaluamos el efecto de su activación sobre la liberación de [³H]-GABA en rebandas de la SNr. Para éste propósito utilizamos dos agonistas: el lisofosfatidilinositol (LPI), propuesto como un agonista endógeno (Oka y cols., 2009) y el agonista sintético O-1602 (Li y cols., 2013). Ambos compuestos aumentan la liberación de [³H]-GABA inducida por K⁺ [15 mM], éste efecto es dependiente de la concentración. La IC₅₀ del LPI es 20 nM (InC: 9 a 35 nM) con una estimulación máxima de 73 % con respecto al control, mientras que para el O-1602 la IC₅₀ fue de 90 nM (InC: 16 a 500 nM) y una estimulación máxima de 80 % (Fig. 10). Puesto que la IC₅₀ del LPI es menor y éste se ha propuesto como el agonista endógeno, en los futuros experimentos usamos LPI [100 nM].

Para corroborar que el aumento en la liberación de [³H]-GABA por el LPI y O-1602 era dependiente de la activación de GPR55 usamos los antagonistas CID16020046 a una concentración de 400 nM (Kargl y cols., 2013) y cannabidiol (CBD) 200 nM (Ryberg y cols., 2007). La pre-incubación de las rebandas de la SNr con los antagonistas durante 20 minutos previene el aumento en la liberación estimulado por LPI [100 nM]. Porcentaje de liberación con respecto al control, LPI: 164.5 ± 6.5, CID: 100.4 ± 4.6, CID/LPI: 106.3 ± 5.9, CBD: 98.87 ± 8.5 y CBD/LPI: 107 ± 4.5. Diferencias estadísticas: LPI vs. control, diferencia significativa (ds)=64.5, p<0.001; LPI vs. CID/LPI, ds=58, p<0.001; LPI vs. CBD/LPI, ds = 57.4, p <0.001; F = 29.4, df = 5, ANOVA de una vía y Tukey post-test, n = 3 experimentos, 4 replicas por experimento) (Fig. 11A).

El CID y el Cannabindiol también previenen el efecto del agonista sintético O-1602 [100 nM]. Porcentaje de liberación con respecto al control, O-1602: 159.5 ± 10.3 , CID: 100.4 ± 4.56 , CID/O-1602: 93.7 ± 3.3 , CBD: 98.87 ± 8.5 y CBD/O-1602: 102.4 ± 7.1 . Diferencias estadísticas: O-1602 vs. control, $ds = 59.5$, $p < 0.001$; O-1602 vs. CID/O-1602, $ds = 65.7$, $p < 0.001$; O-1602 vs. CBD/O-1602, $ds = 57$, $p < 0.001$; no hubo diferencias significativas de los antagonistas con respecto al control; $F = 14.3$, $df = 5$, ANOVA de una vía y Tukey post-test, $n = 3$ experimentos, 4 replicas por experimento) (Fig. 11 B).

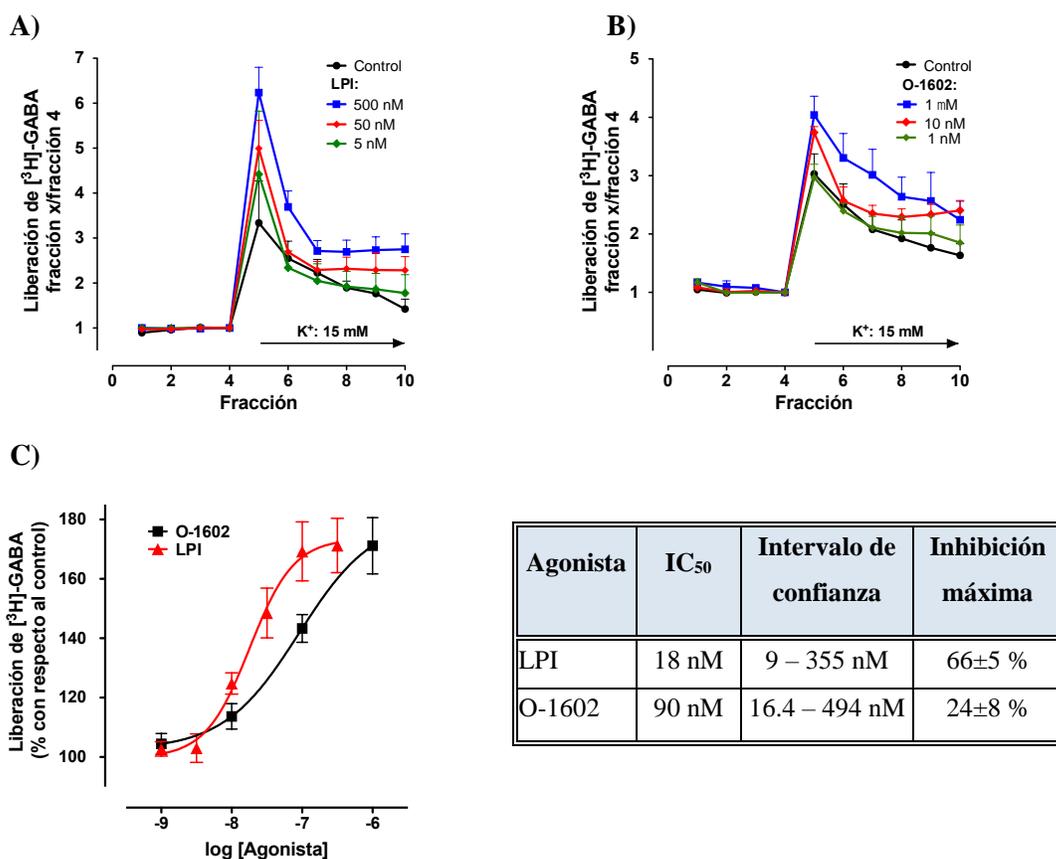


Figura 10. El LPI y el O-1602 aumentan la liberación de [³H]-GABA en la SNr. Porcentaje de liberación cuantificado como el área bajo la curva. La liberación de [³H]-GABA fue inducida por potasio 15 mM en rebanadas de la SNr en presencia de **A)** LPI u **B)** O-1602 en un rango de concentraciones de 1 a 1000 nM. **C)** Curvas dosis-respuesta de LPI (IC₅₀ = 20 nM, IC: 9 a 35 nM) y O-1602 (IC₅₀ = 90 nM, InC: 16 a 500 nM) para la liberación de GABA. Cada punto representa la media aritmética ± ESM para cada concentración señalada, $n = 3$ experimentos con 4 replicas cada uno.

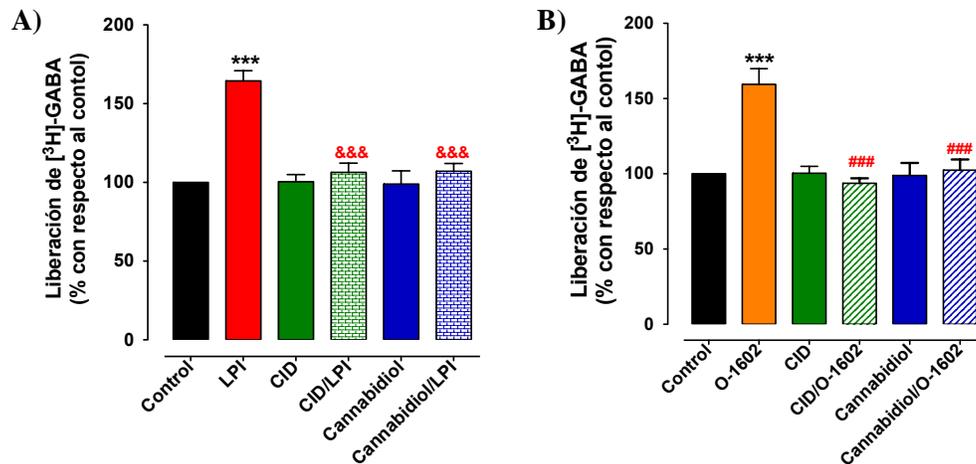


Figura 11. Los antagonistas del receptor GPR55 previenen el aumento en la liberación de [3H]GABA inducido por el LPI y el O-1602. Área bajo la curva del curso temporal de la liberación de [3H]GABA graficada como porcentaje con respecto al control. Los antagonistas del receptor GPR55 CID16020046 [400 nM] y cannabidiol (CBD) [200 nM] previenen el aumento en la liberación de GABA inducido por **A)** LPI [100 nM] u **B)** O-1602 [100 nM] aumenta un $64.2\% \pm 6.5$ la liberación de GABA, O-1602 64.6 ± 10.7 efecto que se previene con el antagonista del receptor GPR55 CID16020046. Se representa la media aritmética \pm ESM, $n = 3$ experimentos, 4 réplicas en cada uno. ANOVA de una vía y Tukey post-test, *** $p < 0.001$ con respecto al control, &&& $p < 0.001$ con respecto al LPI y ### $p < 0.001$ con respecto a O-1602.

Otro abordaje experimental que realizamos para mostrar que GPR55 modula la neurotransmisión GABAérgica a nivel de la presinápsis fue evaluar la liberación de [3H]GABA en sinaptosomas de la SNr. El LPI [200 nM] aumenta la liberación de [3H]-GABA, mientras que el antagonista CID16020046 previene esta facilitación inducida por el LPI en sinaptosomas (porcentaje de liberación con respecto al control, LPI: 168.7 ± 9.9 , CID: 106.3 ± 14.3 , CID/LPI: 119.3 ± 12.3 , Diferencias estadísticas: LPI vs. control, $ds = 68.7$, $p < 0.01$; LPI vs. CID, $ds = 62.3$, $p < 0.05$; LPI vs. CID/LPI, $ds = 49.4$, $p < 0.001$; no hubo diferencias significativas del CID con respecto al control; $F = 8.5$, $df = 3$, ANOVA de una vía y Tukey post-hoc, $n = 3$ experimentos, 4 replicas por experimento) (Fig. 10). Estas evidencias sugieren que el efecto del LPI es directamente en las terminales de la SNr.

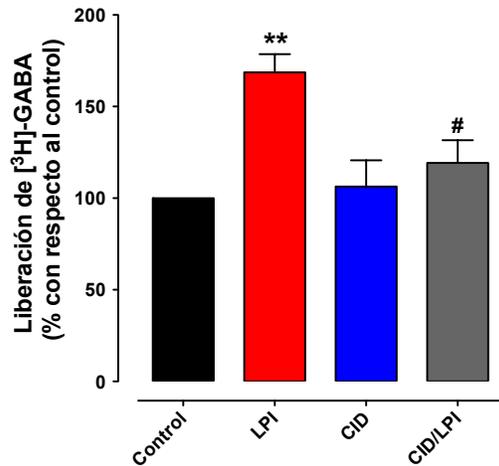


Figura 11. La activación del receptor GPR55 aumenta la liberación de [³H]-GABA en sinaptosomas de la SNr. Área bajo la curva de la liberación de GABA en sinaptosomas. El estímulo despolarizante se aplicó en la quinta y sexta fracción, el LPI [200 nM] aumentó la liberación de [³H]-GABA, efecto que se prevenido por CID16020046 [200 nM]. ANOVA de una vía y Tukey post-hoc, **p<0.01 con respecto al control y # p < 0.01 con respecto al LPI.

7.6 La estimulación en la liberación de [³H]GABA inducido por el LPI depende de Ca²⁺ extracelular, pero es independiente de reservorios intracelulares de Ca²⁺

En neuronas del ganglio de la raíz dorsal la activación de GPR55 estimula la liberación de Ca²⁺ de compartimentos intracelulares, efecto dependiente de la activación de la fosfolipasa C (PLC), y en neuronas de la sustancia gris periacueductal activa a los canales de calcio tipo P/Q (Deliu y col., 2015). Para determinar si en nuestro modelo experimental el efecto facilitador sobre la liberación de GABA mediado por el LPI dependía de Ca²⁺ extracelular o de reservorios intracelulares sensibles a IP₃, en la solución de perfusión agregamos EDTA para quelar el Ca²⁺ y en otra serie de experimentos bloqueamos a la fosfolipasa C (PLC) con U-73122 [10 mM] para prevenir la formación de IP₃. En la imagen 13 se observa que el inhibidor de la PLC no previene el efecto del LPI sobre la liberación de GABA (LPI: 158 ± 5.6, U-73122: 105.5 ± 11.1, U-73122/LPI: 143.8 ± 6.5, Diferencias estadísticas: LPI vs. control, ds = 58, p<0.01; U-73122 vs. LPI, ds = 43.8, p<0.05; U-73122/LPI vs. U-73122, ds = 38.3, p<0.05; no hubo diferencias significativas del U-73122 con respecto al control; F = 16, df = 3, ANOVA de una vía y Tukey post-test, n = 3 experimentos, 4 replicas por experimento). En presencia de EDTA no se observa la estimulación de la liberación inducida por K⁺ 15 mM y por el LPI 100 nM; LPI: 166 ± 13.6, EDTA/LPI: 9 ± 1. Diferencias estadísticas: LPI vs. control, ds = 66, p<0.01; EDTA vs. control, ds = 99, p<0.001; EDTA/LPI vs. LPI, ds = 156, p<0.001; F = 100.8, df = 2, ANOVA de una vía y Tukey post-test, n = 3 experimentos, 4 replicas por experimento).

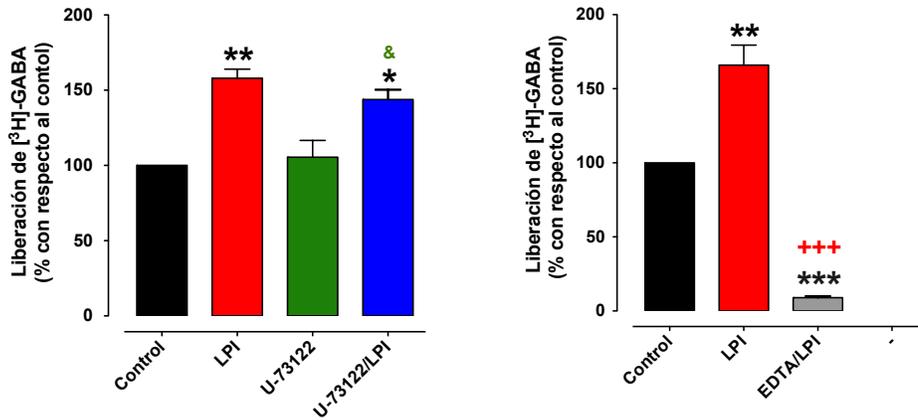


Figura 13. El aumento en la liberación de $[^3\text{H}\text{-GABA}]$ inducido por el LPI no involucra la PLC, pero es dependiente de Ca^{2+} extracelular. Área bajo la curva de la liberación de $[^3\text{H}]\text{GABA}$ graficada como porcentaje con respecto al control en presencia de **A)** U-73122 o **B)** EDTA. El inhibidor de la PLC U73122 [10 μM] no modifica la liberación *per se* y no previene el aumento en la liberación inducido por el LPI; el EDTA previene la liberación estimulada por K^+ y por el LPI [100 nM]. N=3 experimentos en cada gráfico, 3 replicas en cada uno, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ con respecto al control, & $p < 0.05$ con respecto a U-73122 y +++ $p < 0.001$ con respecto a LPI, ANOVA de una vía y Tukey post-test.

Con base en los resultados anteriores planteamos que la vía PLC-IP3 no modula el efecto del LPI, para descartar la participación de Ca^{2+} proveniente de depósitos intracelulares los sinaptosomas de la SNr fueron preincubados con thapsigargina de acuerdo al protocolo establecido por Khvotchev y cols., (2000). El CaCl_2 fue retirado del medio de perfusión en la segunda fracción y la thapsigargina [2 μM] se agregó a partir de la cuarta fracción colectada y hasta el final del experimento, el LPI se colocó en la sexta fracción y el estímulo despolarizante (K^+ : 3 mM, Ca^{2+} : 2 mM) se aplicó en la fracción 8 y 9 (Fig. 14 A). Para el análisis de los datos, se obtuvo el área bajo la curva del curso temporal y se agrupó en condiciones normales (K^+ : 3 mM) y con el estímulo despolarizante (K^+ : 15 mM). En la gráfica 14 B se observa que en condiciones no despolarizantes la thapsigargina aumenta la liberación de GABA *per se* (thapsigargina vs control, $d_s = 1.4$, $p < 0.05$) y en presencia de LPI (thapsigargina/LPI vs Control, $d_s = 1.21$; $p < 0.05$), mientras que el LPI no tiene efecto en condiciones basales (LPI vs Control, ns), $F = 9.36$, $df = 3$, ANOVA de una vía y Tukey post-test.

Cuando se despolariza con K^+ el efecto de la thapsigargina observado en condiciones basales se conserva (thapsigargina vs control, $ds = 1.36$; $p < 0.05$), el LPI aumenta la liberación (LPI vs control, $ds = 1.3$; $p < 0.05$) y en presencia de ambas drogas se observan efectos aditivos (thapsigargina/LPI vs. thapsigargina, $ds = 1.47$, $p < 0.05$; thapsigargina/LPI vs. LPI, $ds = 1.5$, $p < 0.05$), $F = 15.89$, $ds = 3$, ANOVA de una vía y Tukey post-test (Fig 14 C).

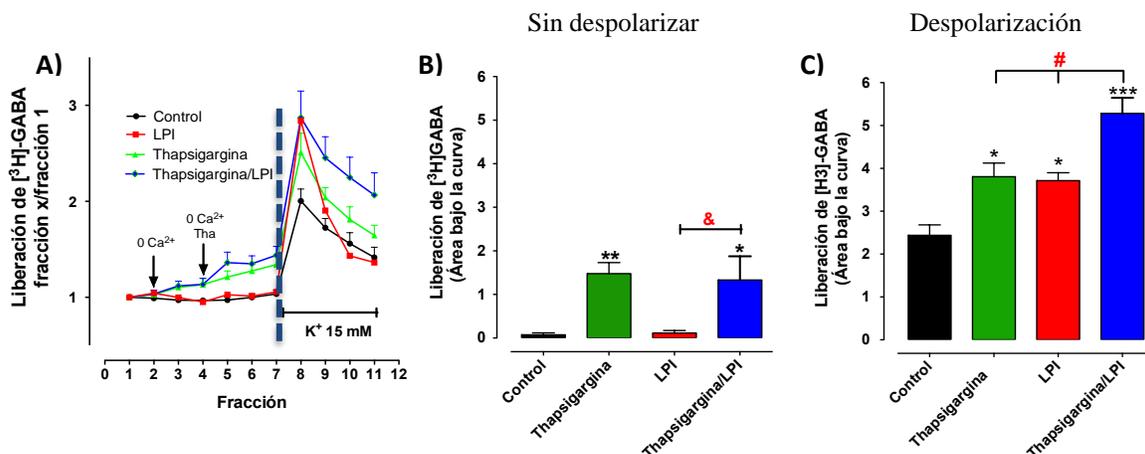


Figura 14. La facilitación de la liberación de [3H]GABA estimulada por el LPI es independiente de reservorios intracelulares de Ca^{2+} en sinaptosomas de la SNr. A) Curso temporal de la liberación de [3H]-GABA en la SNr, en la fracción 2 se retiró el Ca^{2+} de la solución de perfusión, en la fracción 4 se agregó thapsigargina 2 μM y se mantuvo hasta el final del experimento; el estímulo despolarizante se aplicó en las fracciones 8 y 9. B) Área bajo la curva del curso temporal en A antes del estímulo despolarizante, la thapsigargina favorece la liberación y el LPI no tiene efecto. C) Liberación durante el estímulo despolarizante, el efecto de la thapsigargina en condiciones sin despolarizar se mantiene, el LPI promueve la liberación con respecto al control y en presencia de ambos se observa un efecto aditivo sobre la liberación. $N = 3$ experimentos, 3 replicas en cada uno. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ con respecto al control; & $p < 0.05$ con respecto a LPI y # $p < 0.05$ con respecto a thapsigargina/LPI. ANOVA de una vía y Tukey post-test.

Los resultados sugieren que la liberación de GABA inducida por la activación de GPR55 con LPI no depende de la PLC y de reservorios intracelulares de Ca^{2+} . Por otra parte, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que la liberación de [3H]GABA en la vía estriatonigral depende de la vía AMPc/PKA (Arias-Montaña y cols., 2007), por este motivo decidimos evaluar su participación en el efecto del LPI.

7.7 El efecto estimulador de GPR55 sobre la liberación de [³H]GABA depende de la proteína cinasa A (PKA) y de la formación de AMPc

En nuestro modelo el inhibidor de la PKA H-89 [10 μ M] no tuvo efecto *per se*, pero previene el aumento de la liberación inducido por LPI (LPI vs control, ds = 53.27, $p < 0.001$; H-89/LPI vs LPI, ds = 46.76, $p < 0.01$) (Fig. 15 A). Para determinar si la estimulación por el LPI depende de AMPc utilizamos un análogo permeable, el 8-Br-AMPC (Jijón-Lorenzo y cols., 2018) a una concentración de 250 μ M, éste compuesto aumenta la liberación GABA y tiene efectos oclusivos con el LPI (Porcentaje con respecto al control, LPI: 171.8 ± 3.71 , 8-Br-AMPC: 170.8 ± 15.85 , 8-Br-AMPC/LPI: 166.7 ± 8.45 . Diferencias estadísticas: LPI vs. control, ds = 71.8, $p < 0.01$; 8-Br-AMPC vs. control, ds = 70.7, $p < 0.01$; 8-Br-AMPC/LPI vs. control, ds = 66.6, $p < 0.01$; no hubo diferencias significativas entre LPI, 8-Br-AMPC y 8-Br-AMPC/LPI; $F = 13.21$, $df = 3$, ANOVA de una vía y Tukey post-test, $n = 3$ experimentos, 4 replicas por experimento) (Fig. 15 B).

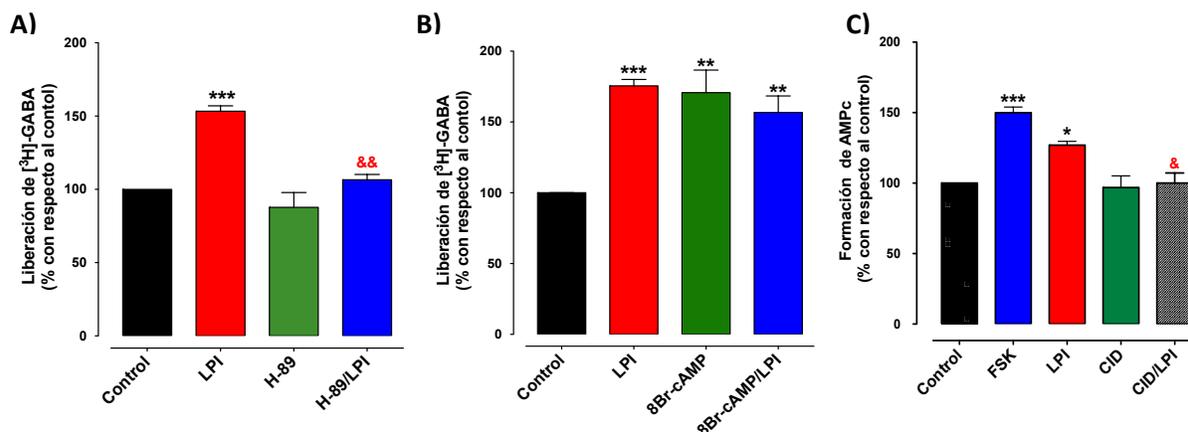


Figura 15. El receptor GPR55 promueve la liberación de GABA a través de la activación de la PKA y aumenta la formación de [³H]AMPC en sinaptosomas de la SNr. Liberación de [³H]GABA representada como porcentaje con respecto al control, el inhibidor de la PKA no tiene efecto sobre la liberación, sin embargo previene el efecto estimulador del LPI en la liberación (A); por otra parte el análogo sintético del AMPc (8Br-AMPC), mimetiza el efecto del LPI al estimular la liberación y ambos tiene efectos oclusivos (B). C) Formación de [³H]AMPC en sinaptosomas de la SNr. La FSK aumenta en un 50 % los niveles de [³H]AMPC, el LPI genera un aumento de aproximadamente 25 %, el cual se bloqueó con el antagonista de GPR55 CID16020046 [400 nM], $n=3$ experimentos, 4 replicas en cada uno. ANOVA de una vía y Tukey post-test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ con respecto al control; & $p < 0.05$, && $p < 0.01$ con respecto a LPI.

Los resultados anteriores sugerían que la vía AC-AMPC-PKA participa en la vía de señalización de GPR55, el siguiente paso fue determinar si la activación de éste receptor estimulaba la formación de [³H]AMPC en sinaptosomas de la SNr, en la figura 15 C se observa que la forskolina [10 µM] (utilizada como control positivo) aumenta la formación de [³H]AMPC (150 ± 4 %), el LPI [1 µM] también estimula la formación de AMPC de forma modesta pero significativa con respecto al control (127 ± 2.7 %), efecto que se previene con el antagonista del receptor GPR55 CID16020046 [1 µM] (100 ± 7.1 %).

7.8 Participación de las proteínas G $\alpha_{s/olf}$ y de las isoformas 5 y 6 de la adenilato ciclasa en la estimulación de la liberación de [³H]GABA inducida por el LPI

Hasta el momento hemos observado que la liberación de [³H]GABA inducida por el LPI depende de la formación de AMPC y de la activación de la PKA. La mayor parte de la liberación de [³H]GABA por la activación del receptor D1 en las terminales estriato-nigrales dependen de la activación de la AC 5/6 y de la proteína G α_{olf} (Avalos-Fuentes y cols., 2013), por esta razón evaluamos la participación de estas isoformas y de la subunidad α de las proteínas Gs/olf. El NKY80 [10 µM], un inhibidor de la AC 5/6 (Brand y cols., 2013) disminuyó la liberación *per se* (Control: 100 % vs NKY80: 81.75 ± 4 %, p<0.05); el LPI aumenta la liberación en ausencia (LPI: 144.8 ± 6.8 & vs control: 100 %) o presencia de NKY80 (NKY80/LPI: 119.1 ± 3.01 % vs NKY80: 81.8 ± 4 %, p<0.001), es decir que el NKY80 no previene el efecto del LPI, F = 38.3, df = 3, AVOVA de una vía y Tukey post-test, n = 4 experimentos, 4 replicas en cada uno (Fig. 16 A). En otros grupos experimentales se agregó toxina colérica (ChTx) la cual activa a las proteínas G $\alpha_{olf/s}$, Jones y cols., 1990) 3 horas antes de los experimentos de liberación de acuerdo al protocolo de Ari y cols. (1989), la toxina colérica no evita la estimulación en la liberación de GABA por el LPI (LPI: 149.4 ± 10.5 vs Control: 100 %, p<0.05; ChTX/LPI: 140.5 ± 7.5 vs Control: 100 %, p<0.05; ChTX/LPI: 140.5 ± 7.5 vs Control: 97.65 ± 9.5 %, p<0.05, F = 11.27, df = 3, ANOVA de una vía y Tukey post-test), n = 3 experimentos, 4 replicas en cada uno (Fig. 16 B). La viabilidad de la toxina colérica fue corroborada en experimentos donde se evalúa el curso temporal de la liberación de [³H]GABA en presencia de la toxina (Anexo 3).

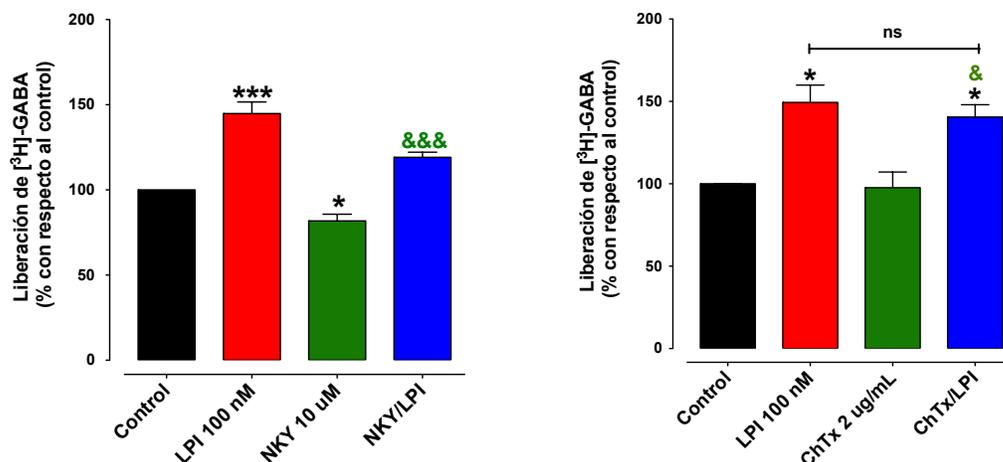


Figura 16. La AC 5/6 y las subunidades $G\alpha_{s/olf}$ no modulan el efecto del LPI sobre la liberación de [3H]GABA. A) Porcentaje de liberación con respecto al grupo control en presencia de LPI 100 nM, NKY80 10 μ M o ambos compuestos, observése que el NKY80 disminuye la liberación con respecto al control pero no previene el efecto del LPI (KNY/LPI vs NKY). **B)** El LPI aumenta la liberación de GABA en presencia (LPI vs control) o ausencia de la toxina colérica (ChTx/LPI vs ChTx). * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$ con respecto al control, &&& $p < 0.001$ con respecto a NKY y & $p < 0.05$ con respecto a ChTx, ANOVA de una vía y Tukey post-test, $n = 4$ experimentos, 4 réplicas en cada uno.

En conjunto, estos resultados sustentan la hipótesis de que el receptor se expresa en las terminales estriato-nigrales y que su activación aumenta la liberación de [3H]GABA, efecto dependiente de Ca^{2+} extracelular, de la formación de AMPc e independiente de la AC 5/6 y de la PKA. En la discusión se comentará acerca de las probables vías de señalización implicadas en tal efecto. Retomando los objetivos planteados el siguiente paso fue evaluar la probable formación de heterómeros CB1-GPR55 en neuronas espinosas medianas del núcleo estriado y en su aferencias a la sustancia negra reticulada.

7.9 El receptor CB1 forma heterómeros con GPR55 en la vía directa de los ganglios basales

Después de determinar la expresión y función del receptor GPR55 en la vía estriato-nigral, evaluamos la presencia del heterómero CB1-GPR55 en el núcleo estriado de rata con el ensayo de proximidad de ligando, el cual permite identificar heterómeros en sistemas nativos (Debaize y cols., 2017). En la figura 17 se muestra la presencia del dímero como puntos rojos en torno al núcleo y alejados de éste, al cuantificar el número de puntos de 6 campos ópticos obtuvimos un promedio de 140 puntos en el estriado intacto, mientras que tras la lesión del estriado con ácido kaínico ($1\mu\text{g}/\mu\text{L}$) el número de heterómeros disminuye de forma significativa (Control 139 ± 8.6 vs Lesionado: 85.6 ± 11.1 , $p < 0.001$). En los controles negativos se observó un marcaje inespecífico de 12.67 ± 4.1 para CB1-D4 y de 5.1 ± 1 para el control negativo técnico (en ausencia de anticuerpos primarios), sin embargo es considerablemente menor que el control (Control: 139 ± 8.6 vs CB1-D4: 12.67 ± 4.1 , $p < 0.001$; Control: 139 ± 8.6 vs Negativo: 5.1 ± 1 , $p < 0.001$). $F = 65.5$, $df = 3$, ANOVA de una vía y Tukey post-test, $n = 6 - 7$ por cada grupo experimental.

Posteriormente, determinamos si el heterodímero CB1-GPR55 se expresa en las MSN de la vía directa combinando el ensayo de PLA con la técnica de inmunofluorescencia en presencia de un anticuerpo específico para la sustancia P (como marcador las MSN de la vía directa, Gerfen y Bolam, 2010). En la figura 18 se indica con cabezas de flecha a células positivas a sustancia P (marcaje en verde) que co-localizan con el heterómero (denotado por puntos rojos), también se encontró marcaje positivo para el dímero en torno a cuerpos celulares que no fueron positivos a sustancia P y en regiones fuera del soma, probablemente el heterómero también se localice en otros tipos celulares, axones y dendritas.

7.10 El receptor CB1 forma heterómeros con GPR55 en la vía directa de los ganglios basales

Después de determinar la expresión y función del receptor GPR55 en la vía estriato-nigral, evaluamos la presencia del heterómero CB1-GPR55 en el núcleo estriado de rata con el ensayo de proximidad de ligando, el cual permite identificar heterómeros en sistemas nativos (Debaize y cols., 2017). En la figura 19 se muestra la presencia del dímero como puntos rojos en torno al núcleo y alejados de éste, al cuantificar el número de puntos de 6 campos ópticos obtuvimos un promedio de 140 puntos en el estriado intacto, mientras que tras la lesión del estriado con ácido kaínico ($1\mu\text{g}/\mu\text{L}$) el número de heterómeros disminuye de forma significativa (Control 139 ± 8.6 vs Lesionado: 85.6 ± 11.1 , $p < 0.001$). En los controles negativos se observó un marcaje inespecífico de 12.67 ± 4.1 para CB1-D4 y de 5.1 ± 1 para el Negativo, sin embargo, es considerablemente menor que el control (Control: 139 ± 8.6 vs CB1-D4: 12.67 ± 4.1 , $p < 0.001$; Control: 139 ± 8.6 vs Negativo: 5.1 ± 1 , $p < 0.001$). $F = 65.5$, $df = 3$, ANOVA de una vía y Tukey post-test, $n = 6 - 7$ por cada grupo experimental.

Posteriormente, determinamos si el heterodímero CB1-GPR55 se expresa en las MSN de la vía directa combinando el ensayo de PLA con la técnica de inmunofluorescencia en presencia de un anticuerpo específico para la sustancia P (como marcador las MSN de la vía directa, Gerfen y Bolam, 2010). En la figura 17 se indica con cabezas de flecha a células positivas a sustancia P (marcaje en verde) que co-localizan con el heterómero (denotado por puntos rojos), también se encontró marcaje positivo para el dímero en cuerpos celulares que no fueron positivos a sustancia P y en regiones fuera del soma, probablemente el heterómero también se localice en otros tipos celulares, axones y dendritas.

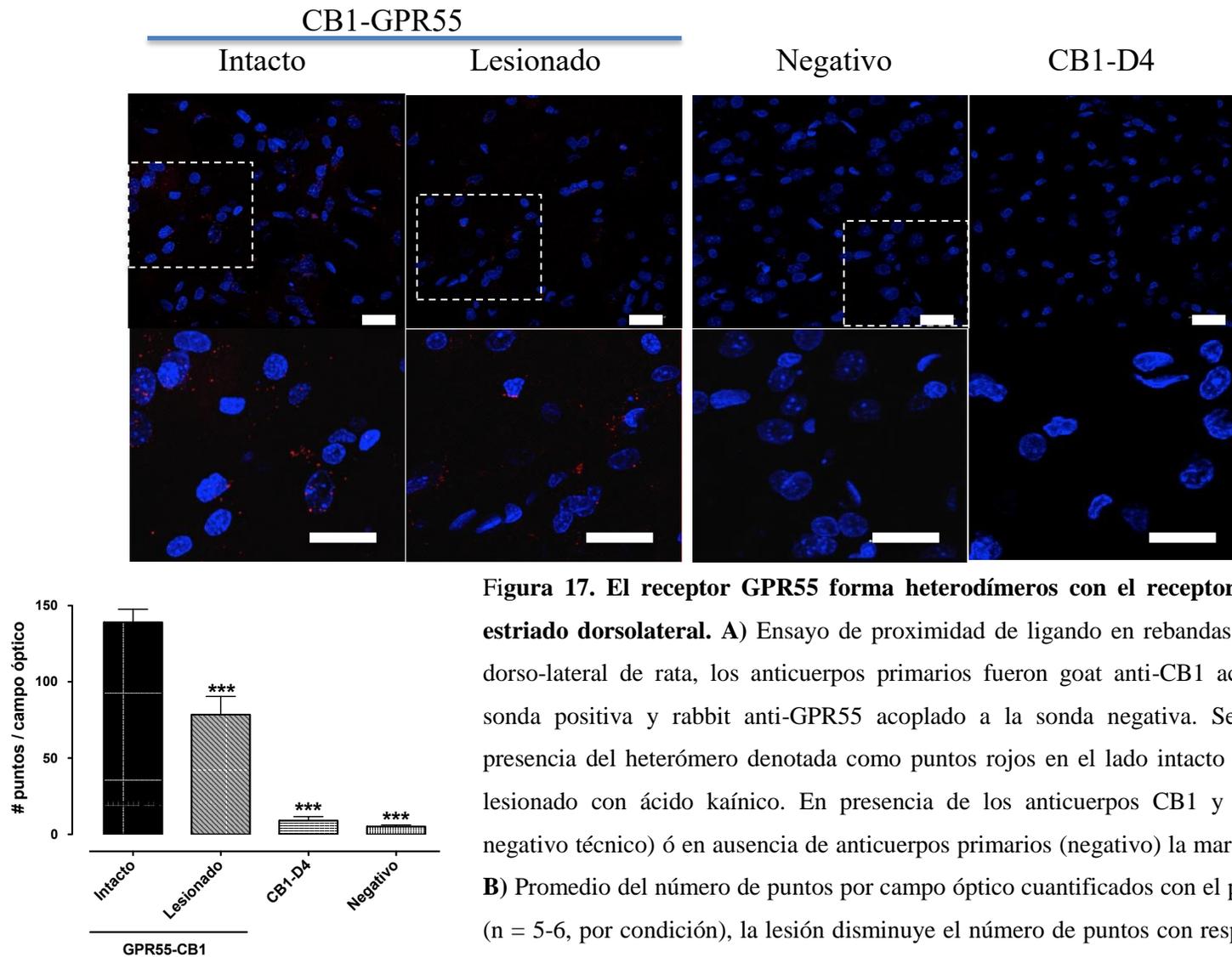


Figura 17. El receptor GPR55 forma heterodímeros con el receptor CB1 en el estriado dorsolateral. A) Ensayo de proximidad de ligando en rebandas del estriado dorso-lateral de rata, los anticuerpos primarios fueron goat anti-CB1 acoplado a la sonda positiva y rabbit anti-GPR55 acoplado a la sonda negativa. Se observa la presencia del heterómero denotada como puntos rojos en el lado intacto y en el lado lesionado con ácido kaínico. En presencia de los anticuerpos CB1 y D4 (control negativo técnico) ó en ausencia de anticuerpos primarios (negativo) la marca es escasa. B) Promedio del número de puntos por campo óptico cuantificados con el programa fiji (n = 5-6, por condición), la lesión disminuye el número de puntos con respecto al lado intacto. *** p<0.001 con respecto al control, ANOVA de una vía y Tukey post-test. Objetivo 63X, barra de escala superior: 20 μ m, inferior 10 μ m.

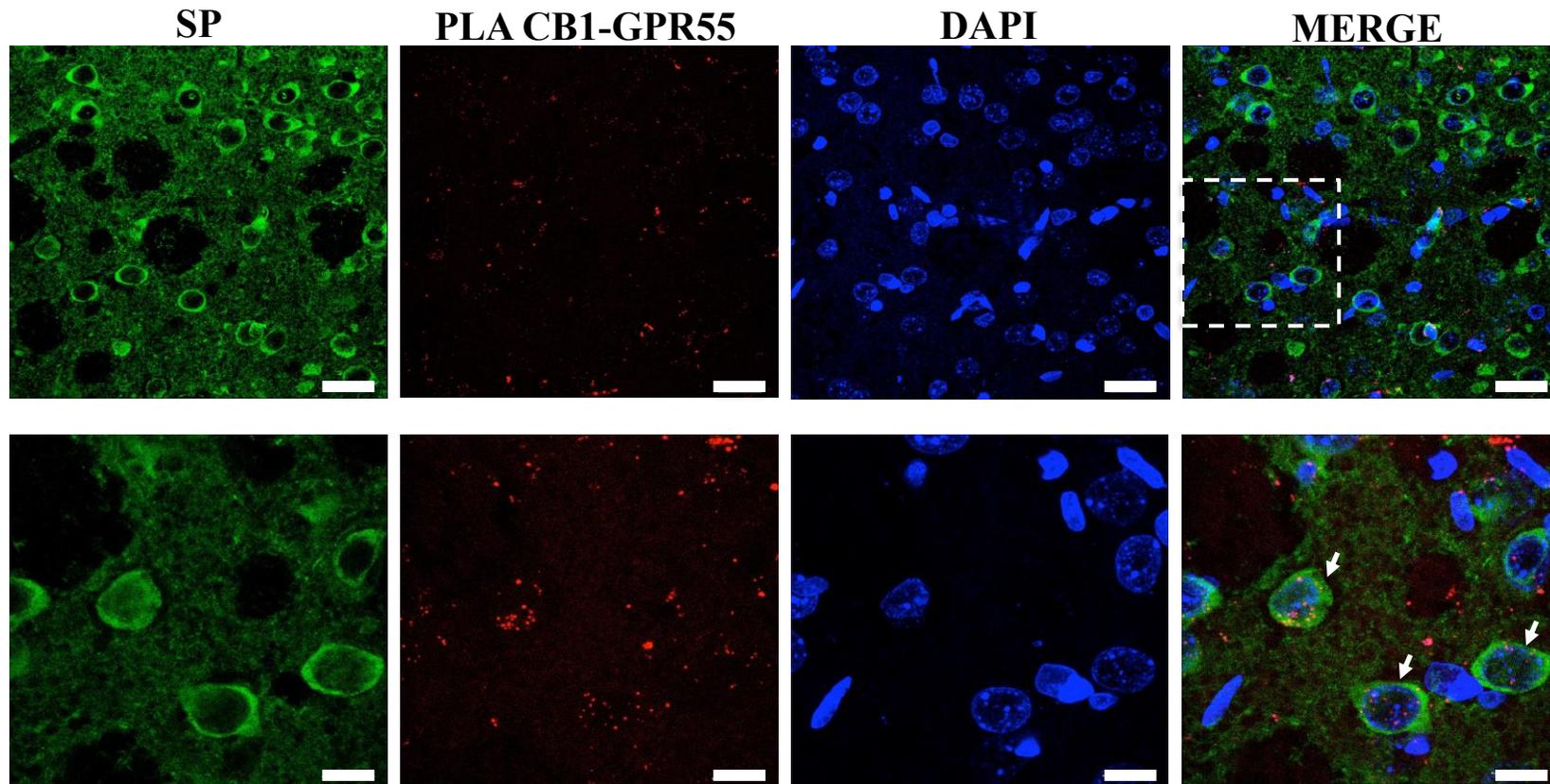


Figura 18. El heterómero CB1-GPR55 se expresa en neuronas positivas a sustancia P. Ensayo de proximidad de ligando acoplado a inmunofluorescencia convencional. Fotomicrografías del estriado dorso-lateral donde se observa marca positiva usando un anticuerpo selectivo para la sustancia P (verde), en rojo se observa la formación del heterodímero CB1-GPR55 por PLA, en el último panel se observa la co-localización del heterodímero con células positivas a sustancia P, como marcador de las neuronas espinosas medianas de la vía directa. Objetivo 63X, barra de escala superior: 20 μ m, inferior 10 μ m.

Continuando con la teoría de que el heterodímero CB1-GPR55 se expresa en terminales estriato-nigrales, la lesión del estriado dorso-lateral disminuyó significativamente el número el número de heterómeros en la sustancia negra reticulada (Intacto: 146 ± 15 vs Lesionado: 103.5 ± 7.24 , * $p < 0.05$, $t = 4.7$, $df = 3$, t de Student test, $n = 5$ campos ópticos por cada condición experimental) (Fig. 19). Otra maniobra experimental que usamos para evaluar el heterómero en terminales fue aislar sinaptosomas de la SNr y realizar un ensayo de co-inmunoprecipitación para los receptores CB1 y GPR55. Al inmunoprecipitar a la muestra con un anticuerpo para GPR55 y realizar un blot para CB1 obtuvimos una banda de aproximadamente 52 kDa correspondiente al peso reportado para este receptor. En la maniobra contraria obtuvimos una banda de 37 kDa, correspondiente al peso esperado para GPR55 (Fig. 20). Con base en estas evidencias podemos sugerir que el heterodímero CB1-GPR55 se expresa en la vía estriato-nigral.

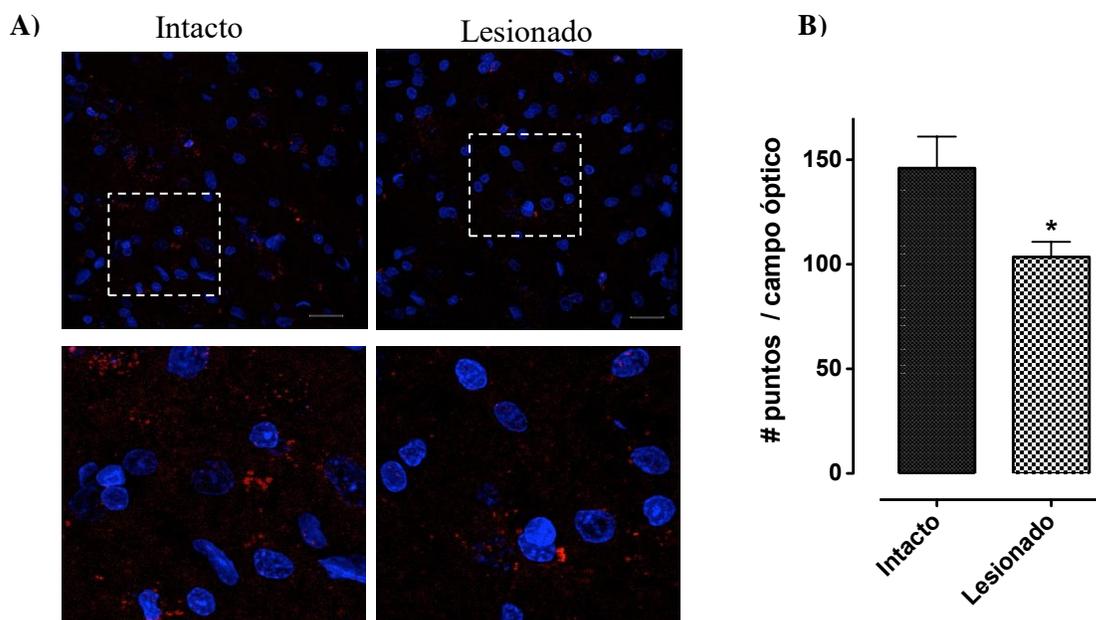


Figura 19. El número de heterodímeros CB1-GPR55 disminuye en la SNr tras la lesión del estriado. A) Ensayo de proximidad de ligando en rebanadas de la SNr 15 días después de la lesión del estriado con ácido kaínico, los puntos rojos indican la presencia del heterodímero en el lado intacto y lesionado, respectivamente. Objetivo 63X, barra de escala superior: 20 μm , inferior 10 μm . B) Promedio del número de puntos por campo óptico de seis muestras.* $p < 0.05$, t de student test.

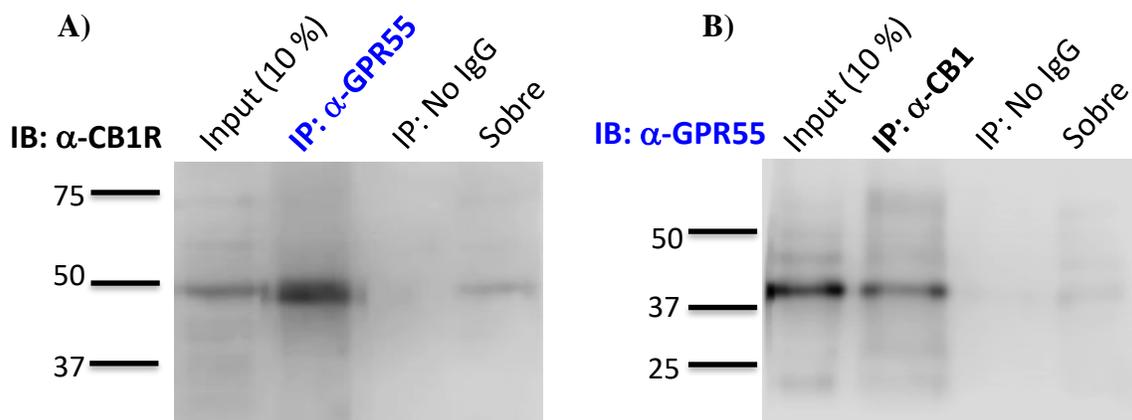


Figura 20. Los receptores GPR55 y CB1 co-inmunoprecipitan en sinaptosomas de la sNr. Ensayo de co-inmunoprecipitación en sinaptosomas aislados de la SNr de rata. A) Se inmunoprecipito usando un anticuerpo contra GPR55, en el inunoblot se observa una banda de aproximadamente 50 kDa correspondiente al receptor CB1, mientras que al inmunoprecipitar al receptor CB1 (B) obtenemos una banda alrededor de los 37 kDa en el blot, la cual corresponde al receptor GPR55, en ambos casos no hay inmunorreactividad en ausencia de IgG como control negativo. Notese cierta expresión de las proteínas de interes la fracción del sobrenadante en ambos casos.

7.11 El agonista del receptor CB1 (ACEA) potencia el aumento en la liberación de [³H]GABA estimulado por del LPI en la SNr

El siguiente paso fue determinar la función del heterodímero CB1-GPR55 sobre la regulación de la neurotransmisión GABAérgica en la SNr, para tal objetivo las rebanadas de SNr fueron perfundidas con el agonista CB1 (ACEA, 100 nM) durante 30 minutos antes de la exposición al LPI [100 nM] (grupo ACEA/LPI). En la figura 21 A se observa que el ACEA disminuye de forma modesta pero significativa la liberación de [³H]GABA (control: 100 % vs ACEA: 80.55 ± 7.7 %, $p < 0.05$), el LPI aumenta la liberación (c^ontrol: 100 % vs LPI: 142 ± 2.2 , $p < 0.001$), sin embargo, la previa activación del receptor CB1 con ACEA potenció la liberación inducida con LPI (ACEA/LPI: 161 ± 6.5 vs LPI: 142 ± 2.2 , $p < 0.05$). Para evaluar la probable participación del receptor CB1 *per se* en la co-activación de los

receptores CB1 y GPR55 las rebanadas fueron pre-incubadas durante tres horas con PTX (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de acuerdo al protocolo establecido por Lev-Ari y cols. (1989). La toxina no modificó la liberación con respecto al control (Control: 100 % vs PTX: 98.5 ± 2.7 %, ns) pero si previno el efecto inhibitorio del ACEA (Control: 100 % vs PTX/ACEA: 101 ± 8.5 , ns). El efecto del LPI en presencia o ausencia de PTX fue similar (144 ± 3.3 % y 142 ± 2.2 %, respectivamente). Finalmente, el efecto potenciador de la co-activación de los receptores CB1 y GPR55 con ACEA y LPI permanece, sin embargo, existe una tendencia a aumentar en presencia de PTX (ACEA/LPI: 161 ± 6.5 y PTX/ACEA/LPI: 176 ± 6.2) (fig. 21 B).

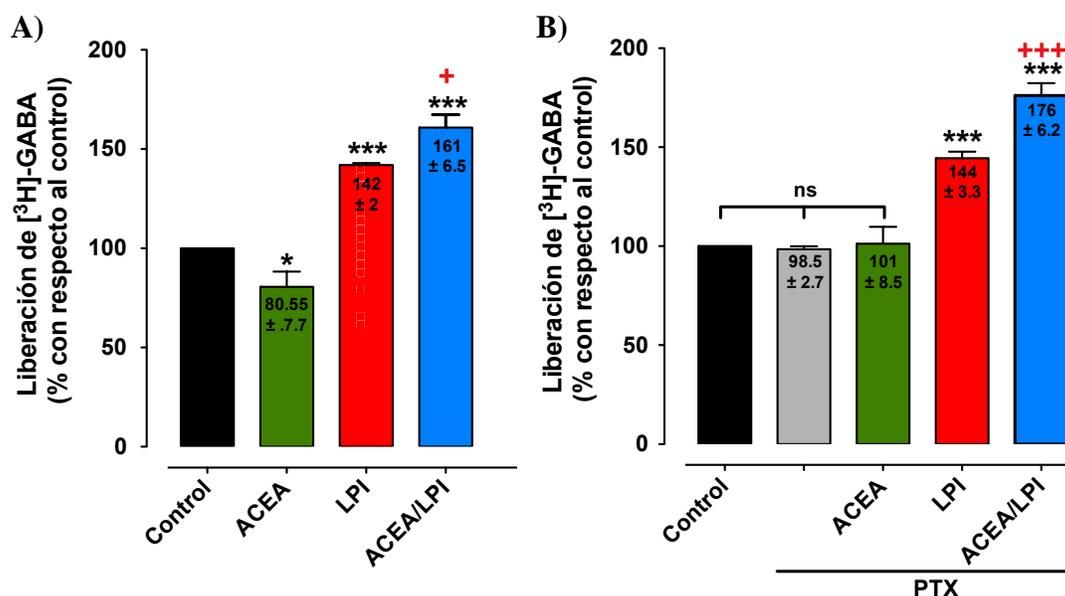


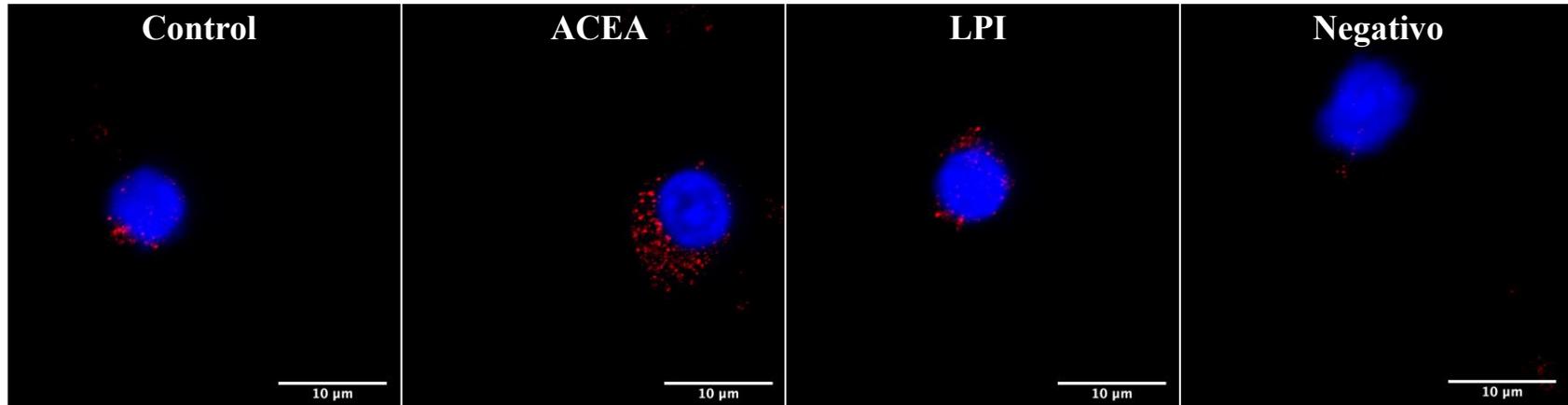
Figura 21. Efecto de la co-activación de los receptores CB1 y GPR55 sobre la liberación de $[^3\text{H}]\text{GABA}$. Liberación de GABA en rebanadas de la SNr de rata en ausencia de PTX (A) y después de la pre-incubación por 3 horas con PTX (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (B). Se representa la media aritmética \pm el error estándar de la media. En ausencia de PTX el ACEA [100 nM] disminuye la liberación de GABA, mientras que el LPI [100 nM] la estimula, con ambas drogas se observa una potenciación sobre la liberación (ACEA/LPI). Por otra parte, la PTX previene la inhibición inducida por el ACEA sin afectar el efecto del LPI, la potenciación en la liberación por el ACEA y LPI tiende a aumentar cuando se pre-incuba con PTX. * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$ con respecto al control; + $p < 0.05$ y +++ $p < 0.001$ con respecto al grupo LPI. ANOVA de una vía y Newman-Keuls post-test, $n = 3$ experimentos, 4 replicas en cada uno.

7.12 La activación del receptor CB1 estimula la formación del heterómero CB1-GPR55 en cultivos neuronales primarios del estriado

En sistemas de transfección heterólogos se ha observado que la activación de un GPCR puede estimular la formación heterodímeros (Imperatore y cols., 2017). Después de observar el efecto funcional de la co-activación de CB1 y GPR55, evaluamos si la activación de los receptores promueve la formación del heterómero CB1-GPR55 por PLA en cultivos neuronales primarios del estriado dorso-lateral de rata. 72 horas después de sembrar a las células, se agregó al medio ACEA (100 nM) o LPI (100 nM) ó el vehículo de ambas drogas (DMSO 0.1 %) durante 30 minutos. Se determinó el cociente del número de puntos por núcleo celular, la exposición a ACEA incrementó la formación del heterómero CB1-GPR55 con respecto al vehículo, (Vehículo: 36.33 ± 6 vs ACEA: 70.6 ± 8.5 , $p < 0.05$), por otra parte, el LPI [100 nM] no modificó la formación del heterómero (Vehículo: 36.33 ± 6 vs LPI: 44 ± 12.5 , ns). Finalmente en el control negativo se detectó una marca basal de 5.2 ± 2 puntos/núcleo, valor que con respecto a los otros grupos experimentales es significativamente menor (Negativo vs Vehículo, ACEA y LPI, $p < 0.05$, $p < 0.001$ y $p < 0.01$, respectivamente; $F = 12.65$, $df = 3$, ANOVA de una vía y Tukey post-test, $n = 5-6$ células por cada condición) (Fig. 22).

En resumen, nuestros datos sugieren que el receptor GPR55 forma heterómeros con el receptor a canabinoides tipo 1 y que la activación del receptor CB1 con ACEA potencia el aumento de la liberación mediada por el agonista GPR55 (LPI) en rebanadas de la SNr de rata; por otra parte, el ACEA promueve la formación del heterómero CB1-GPR55 en cultivos neuronales primarios del estriado. Se necesitan estudios adicionales para esclarecer la vía de señalización implicada en este efecto.

A)



B)

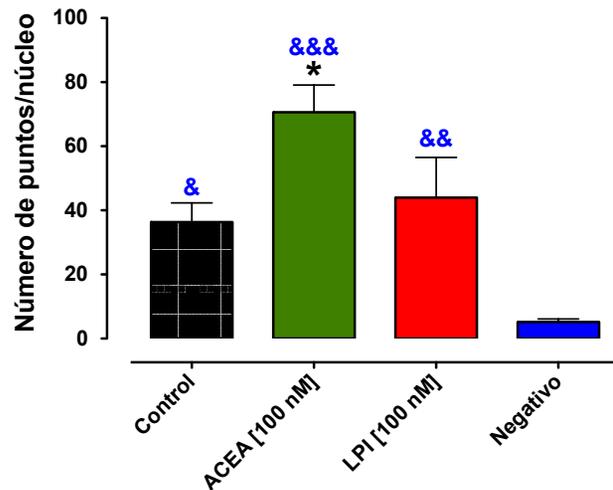


Figura 22. El agonista del receptor CB1 (ACEA) promueve la formación del heterómero CB1-GPR55 en neuronas del estriado. A) Ensayo de proximidad de ligando en cultivos neuronales primarios del estriado después de la exposición durante 30 minutos a DMSO al 0.1 %. B) Promedio del número de puntos por célula bajo las condiciones descritas en (A) El ACEA aumenta la formación de heterómeros y el LPI no tiene efecto con respecto al control. Se observa una marca basal en el control negativo, pero significativamente menor que los demás grupos experimentales. * $p < 0.05$ con respecto al control, & $p < 0.05$, && $p < 0.01$ y &&& $p < 0.001$ con respecto al control Negativo. ANOVA de una vía y Tukey post-test, $n = 5-6$ células por cada condición experimental.

8. DISCUSIÓN

8.1 El receptor CB2 se expresa en neuronas del STN y en terminales subtálamo-nigrales

Durante poco más de una década el receptor a cannabinoides tipo 2 fue considerado como el receptor a cannabinoides periférico, sin embargo, actualmente existe evidencia experimental que apoya la presencia de su RNAm en núcleos del SNC como el globo pálido, el hipocampo y el núcleo estriado (Lanciego y cols., 2011; Kim y Li, 2014; Zhang y cols., 2015). Nosotros diseñamos un par de primers para detectar a las variantes transcripcionales 1, 2 y 3, en los resultados observamos que existe una mayor expresión del receptor CB2 en bazo con respecto a neuronas del núcleo subtalámico, aunado a esto, se encontró que la variante transcripcional 3 sólo se expresa en el bazo, resultado justificado por la expresión diferencial de las isoformas dependiente del núcleo (Zhang y cols., 2015). Para validar los primers, el producto de amplificación fue secuenciado y se realizó un BLASTn en la plataforma de NCBI, los resultados muestran que los primers son específicos para las tres isoformas del receptor CB2 previamente mencionadas (Anexo 1).

La especificidad de los anticuerpos para éste receptor ha sido cuestionada (Baeck y cols., 2013), en este estudio utilizamos el anticuerpo sintetizado por Laboratorios Alomone por que ha sido probado en ratones knock-out a CB2, en estos sujetos experimentales no se observa ausencia total de inmunorreactividad, pero hay una disminución significativa en los ensayos de Western-blot e inmunofluorescencia en el estriado y neuronas dopaminérgicas del VTA (Zhang y cols., 2014; Zhang y cols., 2017). Al evaluar la expresión de la proteína para CB2 observamos su expresión en el soma de neuronas glutamatérgicas del STN por su co-localización con vGLUT2 (Hrabovszky y cols., 2006), presumiblemente a nivel de la membrana plasmática y citoplasma, aunque no descartamos su expresión funcional en el retículo endoplásmico como sucede en neuronas piramidales de la corteza (den Boon y cols., 2012); por otra parte, se sabe que CB2 se expresa en la microglía, astrocitos y oligodendrocitos (Fernández-Ruiz y cols., 2007), en éste estudio no se evaluó el porcentaje de neuronas positivas a CB2, pero la expresión en astrocitos es mínima, pues no se encontro co-localización con la proteína ácida fibrilar de la glia (GFAP) en tejido y en los cultivos neuronales (Anexo 2).

La localización de CB2 en las terminales subtálamo-nigrales se sustenta en la disminución del 50 % de su expresión en sinaptosomas de la SNr después de la lesión del STN con ácido kaínico, aunado a una pérdida del efecto del agonista CB2 (Sánchez-Zavaleta, 2013, Tesis de Maestría). La expresión remanente en sinaptosomas sugiere que CB2R podría localizarse en otras terminales, como las aferetes GABAérgicas del núcleo estriado o globo pálido o colaterales GABAérgicas locales, núcleos donde se ha detectado la expresión del RNAm y/o proteína para CB2 (Lanciego y cols., 2011; Zhang y cols., 2015; Brusco y cols., 2008), al respecto en nuestro grupo hemos observado que los agonistas de CB2 modulan la liberación de GABA en la SNr (datos no publicados). En conjunto, estos resultados aportan evidencias de la expresión del receptor CB2 en el soma de neuronas del núcleo subtalámico y su expresión funcional en las terminales que inervan a la SNr.

8.2 El receptor CB2 modula la neurotransmisión glutamatérgica en las terminales subtálamo-nigrales

En experimentos anteriores determinamos que el GW833972A disminuye la liberación de [³H]Glutamato en la SNr debido a la activación del receptor CB2 presente en las terminales subtálamo-nigrales (Sánchez-Zavaleta, 2013, Tesis de Maestría). Al evaluar el efecto de los agonistas al receptor CB2: GW833972A, GW404833 y JWH133 observamos que los 3 compuestos disminuyen la liberación de [³H]glutamato de forma concentración-dependiente. Al respecto, la constante de inhibición (K_i) de los tres se encuentra en un rango de 3 a 8 nM (Huffman y cols., 1996; Belvisi y cols. 2008; Gallant y cols., 1998), sin embargo, observamos que el más eficaz fue el GW833972A con una inhibición máxima del 66 %, éste efecto diferencial puede ser explicado por la selectividad funcional del receptor CB2, lo cual da origen a la activación de diferentes vías de señalización dependientes del agonista (Atwood y cols., 2012b); otra alternativa es una expresión diferencial de las isoformas del receptor CB2 dependiente del tipo celular y de la especie (Liu et al., 2009; Zhang et al., 2014), lo que podría generar una afinidad diferencial de los agonistas a cada isoforma. La IC₅₀ del GW833972A es similar a la reportada por Dhopeswarkar y Mackie (2016) para los ensayos de reclutamiento de B-arrestina e inhibición en la formación de AMPc.

8.3 El efecto inhibitor sobre la liberación de [³H]Glutamato por la activación de CB2R es dependiente del complejo Gi β / γ y de los canales de calcio tipo P/Q

La mayoría de funciones celulares y las vías de señalización que regula el receptor CB2 se deben al acople que tiene con proteínas Gi/o (Pertwee y cols., 2010), en la Fig. 4 observamos que la inhibición de la liberación inducida por el GW833972A es sensible a la toxina de *Bordetella pertussis* (la cual cataliza la ADP-ribosilación de las subunidades α de proteínas Gi/o e impide su acople a GPCRs (Gierschik, 1992)), esta evidencia sustenta que a nivel de la presinapsis CB2R también se acopla a una proteína Gi/o; tres de los principales efectores de este complejo heterotrimérico que regulan la liberación de neurotransmisores son la enzima AC, los canales de calcio tipo N y P/Q activados por voltaje, y los canales de potasio tipo GIRK (Di Marzo y cols., 20004). En nuestros resultados observamos que el complejo β/γ aparentemente modula de forma negativa a los canales de calcio dependientes de voltaje tipo P/Q, puesto que el inhibidor del complejo β/γ (galeína, Mizuno et al., 2013) y la Agatoxina TK (inhibidor de los canales tipo P/Q) previenen el efecto del GW833972A sobre la liberación de [³H]glutamato.

Estudios iniciales habían demostrado que la modulación de los canales de calcio por el receptor CB2 en sistemas de transfección heterólogos era escasa (Felder, 2005), por ejemplo, en neuronas del ganglio de la raíz dorsal el JWH-133 (agonista CB2) disminuye el calcio intracelular, aunque se desconoce el mecanismo de acción (Sagar y cols., 2005). En estudios recientes realizados con cultivos de neuronas piramidales de hipocampo, el 2-AG disminuye la frecuencia de las corrientes excitadoras postsinápticas (EPSC), este efecto es mediado por la activación del receptor CB2 a nivel presináptico y depende de calcio extracelular (Atwood y cols., 2012a). Por otra parte, el receptor CB2 modula los canales de calcio tipo T en células ganglionares de la retina a través de la proteína cinasa II dependiente de calcio/calmodulina (CaMKII) (Quian y cols., 2017), en nuestras condiciones experimentales es poco probable que éste efector intermediario participe, puesto que CAMKII regula de forma positiva a los canales de calcio tipo P/Q (Jiang y cols., 2008), lo cual conllevaría a un aumento en la liberación de [³H]glutamato, efecto que no se observa. En resumen, estos resultados aportan la primera evidencia de la regulación de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo P/Q por el receptor CB2.

El receptor CB2 decremanta la actividad de la enzima adenilato-ciclasa (AC) y en consecuencia reduce la producción de AMPc y la actividad de la PKA, efecto mediado por la subunidad $G\alpha_i$ (Bayewitch y cols. 1995; Bouaboula y cols., 1996). En resultados anteriores la participación de esta subunidad fue descartada debido a la ausencia de efectos del H-89 (bloqueador de la PKA) y a que el GW833972A no modula la liberación de [3 H]glutamato estimulada por Forskolina (Sánchez-Zavaleta, 2013, Tesis de Maestría). Por otra parte, al evaluar la probable activación directa de la fosfolipasa C por el complejo β/γ de la proteína Gi/o (Betke y cols., 2012), el inhibidor de esta fosfolipasa no modifica el efecto del GW833972A, lo que descarta la participación de esta enzima en la vía de señalización que desencadena la activación del receptor CB2.

La regulación de la liberación de glutamato en esta vía por parte del receptor CB2 podría tener una implicación funcional en el control del movimiento regulado por los ganglios basales, el incremento en la actividad de las neuronas de la SNr esta asociado a hipocinesia, mientras que un aumento en la frecuencia de disparo promueve la hipercinesia (De Long, 1990), la cantidad de GABA y glutamato en la SNr determinan la frecuencia de disparo de estas neuronas y en consecuencia el movimiento (Robertson, 1993). La disminución de glutamato en la SNr disminuiría la actividad de las neuronas de la SNr y promovería una asimetría motora, esto se reflejada en un aumento de giros contralaterales despues de la activación local de CB2R en la SNr giros contralaterales (Sanchez-Zavaleta y cols., 2018).

En la enfermedad de Parkinson se ha observado un aumento en la actividad neuronal del subtálamo y la SNr, debido a ello la inhición en la liberación de glutamato que promueve la activación del receptor CB2 lo postula como un blanco atractivo para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, aunado a los efectos directos sobre la neurotransmisión, es importante señalar que en modelos de Parkinson experimental y en pacientes post-morten se ha observado un aumento en el número de receptores CB2 en migroglía de la sustancia nigra compacta (Gomez-Galvez y cols., 2016; Navarrete, 2017), y la activación de éste receptor tiene efectos neuroprotectores (Javed y cols., 2016).

8.4 El receptor CB2 forma heterómeros con el receptor CB1 en la vía estriato-nigral.

En SNC, el receptor CB1 esta localizado principalmente en la presinápsis (Di-Marzo, 2004), mientras que el receptor CB2 se localiza mayoritariamente en la postsinápsis a nivel del soma o en membranas intracelulares (Brusco y cols., 2008; den Boon y cols., 2012), por otra parte, se ha observado que forma heterómeros tanto en la presinapsis como en post-sinapsis del globo palido externo e interno, y en terminales pálido-nigrales (Sierra y cols., 2015). A traves del ensayo de proximidad de ligando observamos el heterómero CB1-CB2 en el núcleo subtalámico (Fig. 6), en este estudio no determinamos el tipo celular donde se expresa éste heterómero, sin embargo, después de la lesión del STN con ácido kaínico observamos una disminución de aproximadamente 50 % del número de heterómeros en la SNr y una disminución en la co-inmunoprecipitación del receptor CB1 y CB2 en sinaptosomas, resultados que sustentan la expresión del heterómero CB1-CB2 en neuronas de proyección de la vía subtálamo nigral. La expresión residual del 50 % puede provenir del estriado o globo pálido externo, donde se ha observado la formación del heterómero (Callén y cols., 2012; Sierra y cols., 2015).

Los estudios acerca del efecto funcional de éste heterómero son escasos, en la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y que expresa éste heterómero existe una regulación negativa mutua entre ambos receptores sobre la fosforilación de AKT y la diferenciación celular (Callén y cols., 2012), por otra parte, en un modelo de Parkinson inducido por MPTP en *Macaca fascicularis* el número de heterómeros CB1-CB2 disminuye en las neuronas palido talámicas (Sierra y cols., 2015), mientras que en cultivos primarios de miroglia obtenidos de estriado e hipocampo y en presencia de LPS y amiloide- β_{1-42} , respectivamente, el número de heterómeros aumenta (Navarro y cols., 2018). En general, se necesitan más estudios para evaluar el efecto funcional de éste heterómero en condiciones fisiológicas normales y patológicas, además de determinar su expresión funcional en la presinápsis.

8.5 Expresión de GPR55 en la vía directa de los ganglios basales

El receptor GPR55 ha sido propuesto como un candidato para pertenecer a la familia de receptores a canabinoides y su RNAm ha sido identificado en varios núcleos del SNC (Sawzdargo y cols., 1999; Ryberg y cols., 2007), Celorrio y cols. (2017) detectaron la expresión del RNAm y de la proteína para GPR55 en neuronas del estriado de rata, nuestros resultados indican que éste receptor se expresa particularmente en neuronas espinosas medianas positivas a sustancia P, es decir neuronas de la vía directa de los ganglios basales; también se detectó inmunoreactividad en elementos celulares que no co-localizan con SP, al respecto en nuestro grupo de trabajo hemos observado que GPR55 modula la captura de GABA en sinaptosomas del globo pálido externo (datos no publicados), este resultado sugiere que GPR55 podría expresarse también en la vía indirecta de los ganglios basales, aunque se necesitan experimentos adicionales para comprobarlo; otra posibilidad es que se localice en células de la glía como se ha observado en el hipocampo (Kalendrusch y cols., 2013), sin embargo, en este proyecto no se evaluó su expresión y función.

En la sustancia negra reticulada la expresión de GPR55 se observó con un patrón de puntillado similar al reportado en el hipocampo, donde se localiza en la presinapsis de la región CA1 (Sylantsev y cols., 2013), en este trabajo se evaluó su presencia en sinaptosomas de la SNr y observamos una reducción del 50 % de su expresión después de la lesión del estriado con ácido kaínico, el cual promueve la muerte neuronal y disminuye un 70 % del GABA endógeno (Schwarcz y Coile, 1977), esta evidencia indica que el receptor GPR55 se sintetiza en las neuronas espinosas medianas del estriado y es enviado a las terminales que inervan a la SNr. El 50 % de la expresión residual de GPR55 en sinaptosomas podría tener su origen en neuronas del núcleo subtalámico o en neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra pars compacta, ambos núcleos envían sus proyecciones nerviosas a la SNr y en los dos se ha reportado la presencia del RNA mensajero para GPR55 (Celorio y cols., 2017).

8.6 La activación de GPR55 aumenta la liberación de [³H]GABA en la vía estriato-nigral

Los compuestos LPI y O-1602 aumentan la liberación de [³H]GABA de forma concentración-dependiente en rebanadas de la SNr con una EC₅₀ de 18 nM y 90 nM, respectivamente (Fig 10); a pesar de que la farmacología éste receptor a cannabinoides “atípico” ha sido controversial se ha establecido que GPR55 es un receptor específico para el LPI (Falasca y Ferro, 2016), en particular el 2-araquidonil-sn-glicero-3-fosfoinositol (2-AGPI) es la especie con mayor actividad sobre GPR55 (Oka y cols., 2009). La constante de afinidad (kd) del LPI para GPR55 no se ha establecido, sin embargo, la EC₅₀ reportada oscila en un rango de 50 nM a 3.6 μM dependiendo del parámetro que se evalúa (por ejemplo, la unión a GTPγS, la cantidad de Ca²⁺ intracelular, etc.) y del tipo celular (Alhouayek y cols., 2018), la concentración que usamos en la mayoría de los experimentos (100 nM) se encuentra dentro de éste rango y esta por debajo de 5 μM, concentración reportada en sistemas de transfección a la cual el LPI podría tener efectos independientes de GPR55 (Oka y cols., 2007). Con respecto al agonista sintético O-1602, la EC₅₀ obtenida para estimular la liberación de [³H]GABA es menor a la reportada para activar a los receptores CB1 y CB2 (> 30 μM, Ryberg y cols., 2007), además su efecto sobre la neurotransmisión GABAérgica que observamos en la SNr coincide con lo reportado por Musella y cols. (2017) en el estriado, donde el O-1602 aumenta la frecuencia de las corrientes inhibitorias post-sinápticas sin alterar su amplitud, respuesta mediada por la activación del receptor GPR55 presináptico.

Los efectos de ambos agonistas a GPR55 sobre la neurotransmisión GABAérgica fueron prevenidos con la inactivación farmacológica de GPR55 por el CID16020046 [400 nM] y el canabidiol [200 nM], éste último se ha observado que puede actuar sobre blancos moleculares a concentraciones superiores a 5μM como el receptor 5HT1A y GPR6, los cuales se expresan en el estriado y sustancia nigra (Russo y cols., 2005; Burnet y cols., 1995; Laun y cols., 2018), sin embargo, la concentración usada fue menor y similar a la reportada para antagonizar a GPR55 (Ryberg y cols., 2007). En resumen estos resultados

indican que el efecto estimulante del LPI y O-1602 sobre la liberación de [³H]GABA son dependientes de la activación del receptor GPR55.

La fuente de [³H]GABA en las rebanadas de la SNr puede tener tres posibles orígenes: 1) las terminales estriato-nigrales (Misgeld y cols., 2007), las terminales palido-nigrales (Smith y Bolam, 1987) y las colaterales locales de la SNr (Deniau y cols., 2007), sin embargo el efecto del LPI sobre la liberación de [³H]GABA en rebanadas de la SNr se previene totalmente después de la lesión del estriado (Fig. 9), éstos resultados, en conjunto con los experimentos de liberación realizados en sinaptosomas sugieren que el efecto del LPI sobre la neurotransmisión GABAérgica en la SNr es mediado por la activación de GPR55 en las terminales estriato-nigrales. Una regulación indirecta por la dopamina, la cual modula la liberación de GABA de forma indirecta al activar a los receptores D1 de la vía estriato-nigral (Rosales y cols., 1997) se descarta en nuestro modelo, puesto que hemos observado que en ratas reserpinizadas la respuesta del LPI no se modifica (datos no publicados), sin embargo, se necesitan experimentos adicionales para determinar el probable efecto de GPR55 sobre el control de la liberación de glutamato y dopamina en la SNr.

8.7 La liberación de [³H]GABA estimulada por el LPI no depende de la PLC y de Ca²⁺ de reservorios intracelulares

El receptor GPR55 se acopla a las proteínas G α_{12} , G α_{13} y G α_q , pero no a G α_i (Ryberg y cols., 2007; Lauckner y cols., 2008) y la evidencia experimental muestra estimula múltiples vías de señalización (Henstridge y cols., 2010). Lauckner y cols. (2008) observaron que en la línea HEK-293 transfectada con GPR55, éste se acopla a la proteína G α_q , activa a la vía PLC-IP3-IP3R y estimula la liberación de Ca²⁺ de compartimentos intracelulares sensibles a IP3. En éste estudio el efecto del LPI no se previene con el inhibidor de la PLC U-73122 (Jin y cols., 1994) o con la preincubación de thapsigargina, la cual inhibe a la bomba SERCA y descarga el calcio de compartimentos intracelulares (Thastrup y cols., 1990); por otra parte, al quelar el Ca²⁺ de la solución de perfusión con EDTA ya no se observa el efecto del LPI, éstos resultados indican que el incremento en la liberación de [³H]GABA por el LPI no depende del calcio de compartimentos intracelulares, pero si del calcio extracelular. La discrepancia con respecto a otros estudios donde se ha observado que la activación de GPR55 estimula la salida de Ca²⁺ de reservorios intracelulares (Lauckner y cols., 2008; Hendtridge y cols., 2010; Sylantiev y cols., 2013) puede explicarse por la selectividad funcional de los agonistas o por el diferente fenotipo celular evaluado en cada estudio (Laprairie y cols., 2015; Alhouayec y cols., 2018).

En los sinaptosomas de la SNr la thapsigargina [2 μ M] aumenta la liberación de [³H]GABA antes del estímulo despolarizante con K⁺ y en ausencia de Ca²⁺ extracelular, este resultado se sustenta en estudios previos donde la thapsigargina aumenta el Ca²⁺ intracelular en sinaptosomas de cerebro completo de rata (Miguel y cols., 2001; Hrynevich y cols., 2017), al respecto, la presencia de reservorios intracelulares de Ca²⁺ en la presinapsis que modulen la liberación de neurotransmisores se ha descrito en varias regiones del SNC como el cerebelo (Kelm y cols., 2007), la neocorteza (Mathew y Hablitz, 2008) y el globo pálido (Jijon-Lorenzo y cols., 2017), a pesar de éstas evidencias el tema sigue siendo controversial y la discrepancia de los resultados podría explicarse por la falta de sensibilidad de las técnicas para cuantificar el Ca²⁺ en la presinápsis o por efectos diferenciales dependientes del tipo neuronal (de Juan-Sanz y cols., 2017).

8.8 El LPI estimula la formación de AMPc y la activación de la PKA en la SNr, efecto independiente de la proteína G_{α_s} y de la AC 5/6

En la gráfica 15 observamos que el inhibidor de la PKA (H-89) previene la estimulación de la liberación de [3 H]GABA por el LPI y el análogo del AMPc (8-Br-AMPc) tiene un efecto oclusivo con el LPI, aunado a estos resultados la activación de GPR55 estimula formación de AMPc en sinaptosomas de la SNr. En nuestro grupo de trabajo hemos observado que el receptor a dopamina tipo 1 (D1) estimula la vía AMPc-PKA y aumenta la liberación de [3 H]GABA en las terminales estriato-nigrales (Nava-Asbell y cols., 2007), efecto dependiente de una proteína $G_{\alpha_{s/olf}}$ y de la AC5 (Rangel-Barajas y cols., 2011). Cuando evaluamos ésta vía de señalización observamos que el NKY80 [10 mM], un inhibidor selectivo de las isoformas 5 y 6 de la adenilato ciclasa (Brand y cols., 2013) no previenen el efecto del LPI; por otra parte, la pre-incubación con la toxina colérica (la cual activa a las proteínas $G_{\alpha_{olf/s}}$, Janes y cols., 1990) aumenta la liberación de [3 H]GABA estimulada con potasio 15 mM, efecto que desaparece 3 horas después de la incubación (Anexo 3), pero tampoco previene la estimulación de la liberación dependiente del LPI. A pesar de que la isoforma 5 de la enzima AC es la más abundante en el estriado de rata y la principal reguladora de la formación de AMPc (Iwamoto y cols., 2003), el efecto que observamos es independiente de las isoformas 5/6.

En reportes previos se ha observado que en sistemas de transfección heterólogos el receptor GPR55 no se acopla a una proteína G_{α_s} (Ryberg y cols., 2007) y no regula la formación de AMPc (Schröder y cols., 2010), en nuestros resultados observamos que la estimulación de la liberación de [3 H]GABA por el LPI es independiente de una proteína $G_{\alpha_{s/olf}}$ pero que la activación de GPR55 sí promueve la formación de AMPc, una posible explicación a esta discrepancia es que en las terminales estriato-nigrales éste receptor se acople a una proteína $G_{\alpha_{12/13}}$ como se ha observado en sistemas de transfección heterólogos (Ross y cols., 2011) y la subunidad alfa active directamente a la isoforma 7 de la enzima adenilato ciclasa (AC7) para aumentar la formación de AMPc (Jiang y cols., 2008), ésta isoforma se ha descrito en el estriado de rata a nivel de soma, dendritas y axones (Mons y cols., 1998) y es regulada por la interacción directa de la proteína $G_{\alpha_{13}}$ en los dominios C1b y N-terminal de

C1a de la AC 7. Una explicación alterna es que GPR55 se acople a las proteínas $G\alpha_q/G\alpha_{13}$ y activen a RhoA, proteína que inhibe a la cinasa de diacil glicerol (DAGK) y genera un aumento del DAG (McMullan y Murrich, 2007), uno de los efectores de DAG es la proteína cinasa C (PKC), particularmente se ha descrito que la PKC delta activa a la enzima AC 7 y aumenta la formación de AMPc (Deger y cols., 2000). Cualquiera de estas dos posibilidades involucraría la activación de la PKA y la posible forforilación de proteínas presinápticas como los canales de calcio tipo P/Q, SNAP25, sinapsina, entre otros, todas involucradas en la regulación de la liberación de neurotransmisores (Árias-Montaña y cols., 2007; Leenders y Sheng, 2005).

En conjunto estos resultados indican que el aumento en la liberación de [3 H]GABA inducida por el agonista del receptor GPR55 LPI depende de la vía AMPc-PKA sin la participación de la AC 5/6 y de la proteína $G\alpha_s$, ésta es la primera evidencia de que GPR55 promueve la formación de AMPc y favorece la liberación de GABA, sin embargo, se necesitan más experimentos para discernir la vía de señalización involucrada.

8.9 Expresión funcional del heterómero CB1-GPR55 en las terminales estriato-nigrales

El heterodímero CB1-GPR55 ya se ha reportado en el estriado de *Macaca fascicularis* (Martínez-Pinilla y cols., 2014), en este estudio hemos identificado su presencia particularmente en el soma de neuronas positivas a sustancia P, es decir en neuronas de la vía directa de los ganglios basales (Gerfen y Bolam, 2010). Se ha propuesto que algunos heterómeros como el receptor a GABA B se forman desde el retículo endoplasmico y por medio de transporte vesicular se envían a la membrana celular (Margete-Mitrovic y cols., 2000), en este estudio no se evaluó su localización subcelular a nivel del soma, sin embargo, observamos que después de la lesión del estriado dorsolateral hay una disminución significativa del numero de heterómeros en la SNr, este resultado aunado la co-inmunoprecipitación del receptor CB1 con GPR55 en sinaptosomas sugieren que el heterómero es sintetizado en el soma de las MSN de la vía directa y es enviado a las terminales que inervan a la SNr.

Desconocemos los dominios involucrados en la formación del heterómero CB1-GPR55, sin embargo en reportes previos se ha observado que la región C₄₁₇-T₄₃₁ del extremo C-terminal del receptor CB1 interactúa con el dominio rico en Arginina ₂₆₆NRRRVEAARR₂₇₅ de la tercera haza intracelular del receptor D2 (Navarro y cols., 2010; Khan y cols., 2013), estudios preliminares realizados en la base de datos de NCBI indican que el receptor GPR55 carece de éste dominio, a pesar de que se requieren experimentos adicionales para determinar los sitios de interacción entre CB1 y GPR55, la existencia del heterómero ha sido aceptada (Martínez-Pinilla y cols., 2014; Franco y cols., 2016).

En sistemas nativos es difícil determinar la fracción de GPCRs que forman heterómeros y de entidades monoméricas en sistemas nativos con respecto a sistemas de transfección heterólogos (Ferré y cols., 2009), en este trabajo no determinamos la relación estequiométrica del heterómero CB1-GPR55 en el estriado y en la SNr, aunque no descartamos la presencia de entidades homodiméricas CB1-CB1 o GPR55-GPR55, como se ha descrito para el heterodímero CB1-A2A, el cual puede formar heterotretámeros por una unión de los homodímeros CB1-CB1 y A2A-A2A en las neuronas espinosas medianas de la vía indirecta (Bonaventura y cols., 2015).

Cuando evaluamos el efecto funcional del heterómero observamos que el agonista del receptor CB1 (ACEA) disminuye la liberación de [³H]GABA, resultado que coincide con un reporte previo donde el agonista del receptor CB1 WIN55,212-2 disminuye la frecuencia de las corrientes inhibitoras postsinápticas en la SNr (Walmishrath y Szabo, 1991); de forma sorprendente la activación previa del receptor CB1 potencia el efecto del LPI sobre la liberación (Fig. 21), éste fenómeno de cooperatividad positiva se ha observado en la línea celular HEK-293 transfectada con el receptor CB1, donde el agonista ACEA potencia la fosforilación del factor de transcripción NFAT cuando las células se co-transfectan con el receptor GPR55 (Kargl y cols., 2012). La pre-incubación de las rebanadas con la toxina pertusis previene la inhibición de la liberación inducida por ACEA debido al bloqueo de la señalización dependiente de proteínas G α_i (Innis y Aghajanian, 1987), por otra la PTX tiende a aumentar la liberación inducida por el ACEA y el LPI, esto sugiere que en condiciones de co-activación de los receptores CB1 y GPR55 existe una

fracción de receptores CB1 que se acoplan a una proteína $G\alpha_i$ e inhiben la liberación de GABA.

Los mecanismos moleculares involucrados en el efecto potenciador del receptor CB1 sobre GPR55 no se evaluaron, pero contemplamos tres posibles explicaciones:

1) Se ha reportado que la activación de uno de los receptores del complejo heterodimérico puede modificar la afinidad del otro receptor por su ligando, en forma positiva o negativa (Franco y cols., 2008; Ferre, 2015), en nuestros resultados la activación del receptor CB1 con ACEA podría generar un cambio conformacional en GPR55 e incrementar su afinidad a su ligando.

2) Que el aumento en la formación de heterómeros CB1-GPR55 observado después de la exposición con ACEA en los cultivos neuronales primarios, reclute a una mayor cantidad de proteínas G en microdominios, la cantidad de proteínas G es directamente proporcional a la afinidad de un GPCR a su ligando (Kuszk y cols., 2009; Ferre y cols., 2015), al respecto se ha observado que la activación de uno de los receptores del complejo dimérico es suficiente para estimular la formación del heterómero, como en el caso de los heterodímeros del receptor a orexina tipo 1 con CB1 (OX1-CB1) y del receptor D2 con el receptor a somatostatina 5 (D2-SSTR5) (Rocheville y cols., 2000; Imperatore y cols., 2016).

3) Finalmente, que como entidad dimérica (CB1-GPR55) se acople a una proteína $G\alpha_s$, estimule la formación de AMPc y en consecuencia la liberación de [3 H]GABA por encima del efecto del agonista a GPR55 (LPI), esta hipótesis se fundamenta en otros complejos diméricos como del heterómero CB1-5-HT_{2A}, que promueve un cambio de acople de proteína G para 5-HT_{2A} de Gq (al cual se acopla de forma canónica) a Gi (Viñals y cols., 2015), ó en el caso del heterómero CB1-D2, donde el receptor CB1 cambia de una proteína $G\alpha_i$ a $G\alpha_s$ (Kearn y cols., 2005).

Culquiera de las propuestas anteriores es posible y no es mutuamente excluyente, se necesitan estudios futuros para esclarecer los mecanismos moleculares que subyacen a este efecto potenciador sobre la liberación de [3 H]GABA.

9. CONCLUSIONES

- Las neuronas glutamatérgicas del núcleo subtalámico expresan receptores CB2 en el soma y en las terminales subtálamo-nigrales.
- El receptor CB2 inhibe la liberación de [³H]Glutamato en la SNr a través del complejo Gi_{β/γ} y la modulación de los canales de calcio tipo P/Q.
- El receptor CB2 forma heterómeros con el receptor CB1 en la vía subtálamo-nigral de rata.
- El receptor GPR55 se expresa en las terminales estriato-nigrales y su activación aumenta la liberación de [³H]GABA en la sustancia nigra reticulada.
- La estimulación en la liberación de [³H]GABA inducido por la activación del receptor GPR55 involucra a la proteína cinasa A (PKA) y la formación de AMPc, efecto independiente de la proteína Gα_s y de la adenilato ciclasa 5/6.
- Los receptores GPR55 y CB1 forman heterodímeros en la vía estriato-nigral y la co-activación del receptor CB1 potencia el aumento en la liberación generado por la activación de GPR55.
- La activación del receptor CB1 promueve la formación de heterómeros con el receptor GPR55 en neuronas espinosas medianas del estriado.

10. PERSPECTIVAS

- Determinar la función del heterodímero CB1-CB2 en la vía subtálamo-nigral sobre la liberación de glutamato.
- Abordar por técnicas electrofisiológicas la función del receptor CB2 en las terminales subtálamo-nigrales.
- Determinar si el aumento en la liberación de GABA mediado por GPR55 depende de la activación de la proteína $G\alpha_{s13}$ y de la adenilato ciclasa 7.
- Discernir la vía de señalización del heterómero CB1-GPR55 responsable del aumento en la liberación de [3 H]GABA en la SNr.

11. BIBLIOGRAFÍA

Acosta-Garcia J, Hernandez-Chan N, Paz-Bermudez F, Sierra A, Erlij D, Aceves J, Floran B. 2009. D4 and D1 dopamine receptors modulate [3H] GABA release in the substantia nigra pars reticulata of the rat. *Neuropharmacology* 57, 725e730.

Adams IB, Martin BR. 1996. Cannabis: pharmacology and toxicology in animals and humans. *Addiction* 91:1585-1614.

Akopian AN, Ruparel NB, Jeske NA, Patwardhan A, Hargreaves KM. 2009. Role of ionotropic cannabinoid receptors in peripheral antinociception and antihyperalgesia. *Trends Pharmacol Sci.* 30(2):79-84.

Alhouayek M, Masquelier J, Muccioli GG. 2018. Lysophosphatidylinositols, from Cell Membrane Constituents to GPR55 Ligands. *Trends Pharmacol Sci.* 39(6):586-604.

Andó RD, Bíró J, Csölle C, Ledent C, Sperlággh B. 2012. The inhibitory action of exo- and endocannabinoids on [3H]GABA release are mediated by both CB1 and CB2 receptors in the mouse hippocampus. *Neurochem Int.* 60(2): 145-52.

Ari IL1, Schwarz L, Atlas D. 1989. Cholinergic-induced [3H] noradrenaline release in rat brain cortical slices is mediated via a pertussis toxin sensitive GTP binding protein and involves activation of protein kinase C. *Cell Signal.* 1(5):461-70.

Arias-Montaña JA, Floran B, Floran L, Aceves J, Young JM. 2007. Dopamine D(1) receptor facilitation of depolarization-induced release of gamma-amino-butyric acid in rat striatum is mediated by the cAMP/PKA pathway and involves P/Q-type calcium channels. *Synapse.* 61(5): 310-9.

Atwood BK, Straiker A, Mackie K. 2012a. CB2 cannabinoid receptors inhibit synaptic transmission when expressed in cultured autaptic neurons. *Neuropharmacology.* 63(4): 514-23.

Atwood BK, Wager-Miller J, Haskins C, Straiker A, Mackie K. 2012b. Functional selectivity in CB(2) cannabinoid receptor signaling and regulation: implications for the therapeutic potential of CB(2) ligands. *Mol Pharmacol* 81(2):250-263.Ω

Avalos-Fuentes A1, Loya-López S, Flores-Pérez A, Recillas-Morales S, Cortés H, Paz-Bermúdez F, Aceves J, Erlij D, Florán B. 2013. Presynaptic CaMKIIα modulates dopamine D3 receptor activation in striatonigral terminals of the rat brain in a Ca²⁺ dependent manner. *Neuropharmacology*. 71:273-81

Baek JH1, Darlington CL, Smith PF, Ashton JC. 2013. Antibody testing for brain immunohistochemistry: brain immunolabeling for the cannabinoid CB₂ receptor. *J Neurosci Methods*. 216(2):87-95.

Baker D1, Pryce G, Davies WL, Hiley CR. 2006. In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol Sci*. 27(1): 1-4.

Balenga Nariman A B, Aflaki Elma, Kargl Julia, Platzer Wolfgang, Schröder Ralf, Blättermann Stefanie, Kostenis Evi, Brown Andrew J, Heinemann Akos, and Waldhoer Maria. 2011. GPR55 regulates cannabinoid 2 receptor-mediated responses in human neutrophils. *Cell Res*. 21(10): 1452–1469.

Bari M, Bonifacino T, Milanese M, Spagnuolo P, Zappettini S, Battista N, Giribaldi F, Usai C, Bonanno G, Maccarrone M. 2011. The endocannabinoid system in rat gliosomes and its role in the modulation of glutamate release. *Cell Mol Life Sci*. 68(5):833-45.

Bayewitch M, Avidor-Reiss T, Levy R, Barg J, Mechoulam R, Vogel Z. 1995. The peripheral cannabinoid receptor: adenylate cyclase inhibition and G protein coupling. *FEBS Lett*. 375(1-2):143-7.

Belvisi MG, Patel HJ, Freund-Michel V, Hele DJ, Crispino N, Birrell MA. 2008. Inhibitory activity of the novel CB2 receptor agonist, GW833972A, on guinea-pig and human sensory nerve function in the airways. *British Journal of Pharmacology*. 155(4), 547–557.

Benito C, Nuñez E, Tolon RM, Carrier EJ, Rabano A, Hillard CJ, Romero J. 2003. Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains. *J Neurosci* 23: 11136–11141.

Bernardinelli Y, Chatton JY. 2008. Differential effects of glutamate transporter inhibitors on the global electrophysiological response of astrocytes to neuronal stimulation. *Brain Res.* 13;1240:47-53.

Bernath S, 1992. Calcium-independent release of amino acid neurotransmitters: fact or artifact? *Prog. Neurobiol.* 38, 57e91.

Bisogno T, Berrendero F, Ambrosino G, Cebeira M, Ramos JA, Fernandez-Ruiz JJ, Di Marzo V. 1999. Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function. *Biochem Biophys Res Commun.* 256(2):377-80.

Blankman JL y Cravatt BF. 2013. Chemical Probes of Endocannabinoid Metabolism. *Pharmacological Reviews.* 65 (2) 849-871

Blankman JL, Simon GM, Cravatt BF. 2007. A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol, *Chem Biol* 14 (12) 1347–1356.

Bonaventura J1, Rico AJ2, Moreno E1, Sierra S2, Sánchez M1, Luquin N2, Farré D1, Müller CE3, Martínez-Pinilla E4, Cortés A1, Mallol J1, Armentero MT5, Pinna A6, Canela EI1, Lluís C1, McCormick PJ1, Lanciego JL2, Casadó V7, Franco R. 2014. L-DOPA-treatment in primates disrupts the expression of A(2A) adenosine-CB(1) cannabinoid-D(2) dopamine receptor heteromers in the caudate nucleus. *Neuropharmacology.* 79:90-100.

Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Marchand J, Canat X, Bourrié B, Rinaldi-Carmona M, Calandra B, Le Fur G, Casellas P. 1996. Signaling pathway associated with stimulation of CB2 peripheral cannabinoid receptor. Involvement of both mitogen-activated protein kinase and induction of Krox-24 expression. *Eur J Biochem.* 237(3):704-11 *Br J Pharmacol.* 165(8):2561-74.

Brand CS1, Hocker HJ, Gorfe AA, Civasotto CN, Dessauer CW. 2013. Isoform selectivity of adenylyl cyclase inhibitors: characterization of known and novel compounds. *J Pharmacol Exp Ther.* 347(2):265-75.

Breit A, Lagacé M, Bouvier M. 2006. Hetero-oligomerization between beta2- and beta3-adrenergic receptors generates a beta-adrenergic signaling unit with distinct functional properties. *J Biol Chem.* 279(27):28756-65.

Brown AJ1. 2007. Novel cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol.* 152(5):567-75.

Brusco A, Tagliaferro PA, Saez T, Onaivi ES. 2008. Ultrastructural localization of neuronal brain CB2 cannabinoid receptors. *Ann N Y Acad Sci.* 1139:450-7.

Burnet PW, Eastwood SL, Lacey K, Harrison PJ. 1995. The distribution of 5-HT1A and 5-HT2A receptor mRNA in human brain. *Brain Res.* 676:157–168.

Calignano A, La Rana G, Giuffrida A, Piomelli D. 1998. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature* 394 (6690) 277–281.

Callen L, Moreno E, Barroso-Chinea P, Moreno-Delgado D, Cortes A, Mallol J, Casado V, Lanciego JL, Franco R, Lluís C, Canela EI, McCormick PJ. 2012. Cannabinoid receptors CB1 and CB2 form functional heteromers in brain. *J Biol Chem* 287:20851–20865

Canals M, Lopez-Gimenez JF, Milligan G. 2009. Cell surface delivery and structural reorganization by pharmacological chaperones of an oligomerization-defective alpha(1b)-adrenoceptor mutant demonstrates membrane targeting of GPCR oligomers. *Biochem J.* 417(1): 161-72.

Carrier EJ, Kearn CS, Barkmeier AJ, Breese NM, Yang W, Nithipatikom K, Pfister SL, Campbell WB, Hillard CJ. 2014. Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol, which increases proliferation via a CB2 receptor-dependent mechanism. *Mol Pharmacol.* 65(4):999-1007.

Celorrío M, Rojo-Bustamante E, Fernández-Suárez D, Sáez E, Estella-Hermoso de Mendoza A, Müller CE, Ramírez MJ, Oyarzábal J, Franco R, Aymerich MS. 2017. GPR55: A therapeutic target for Parkinson's disease?. *Neuropharmacology*.125:319-332.

Cherif H, Argaw A, Cécyre B, Bouchard A, Gagnon J, Javadi P, Desgent S, Mackie K, Bouchard JF. 2015. Role of GPR55 during Axon Growth and Target Innervation. *eNeuro*. 2(5).

Cilia R. 2018. Molecular Imaging of the Cannabinoid System in Idiopathic Parkinson's Disease. *Int Rev Neurobiol*. 141:305-345.

Cortés H, Paz F, Erlij D, Aceves J, Floran B. 2010. GABA(B) receptors modulate depolarization-stimulated [(3)H]glutamate release in slices of the pars reticulata of the rat substantia nigra. *European Journal of Pharmacology*, 649(1–3), 161–167.

Damian M, Martin A, Mesnier D, Pin JP, Banères JL. 2006. Asymmetric conformational changes in a GPCR dimer controlled by G-proteins. *EMBO J*. 25(24): 5693-702.

de Juan-Sanz J, Holt GT, Schreiter ER, de Juan F, Kim DS, Ryan TA. 2017. Axonal Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ Content Controls Release Probability in CNS Nerve Terminals. *Neuron*. 93(4):867-881.e6. doi: 10.1016/j.neuron.2017.01.010.

De Petrocellis L, Nabissi M, Santoni G, Ligresti A. 2017. Actions and Regulation of Iontropic Cannabinoid Receptors. *Adv Pharmacol*. 80:249-289. doi: 10.1016/bs.apha.2017.04.001.

Debaize L, Jakobczyk H, Rio AG, Gandemer V, Troadec MB. 2017. Optimization of proximity ligation assay (PLA) for detection of protein interactions and fusion proteins in non-adherent cells: application to pre-B lymphocytes. *Mol Cytogenet*. 10:27.

Deliu E, Sperow M, Console-Bram L, Carter RL, Tilley DG, Kalamarides DJ, Kirby LG, Brailoiu GC, Brailoiu E, Benamar K, Abood ME. 2015. The Lysophosphatidylinositol Receptor GPR55 Modulates Pain Perception in the Periaqueductal Gray. *Mol Pharmacol*.

88(2):265-72.

den Boon FS, Chameau P, Schaafsma-Zhao Q, van Aken W, Bari M, Oddi S, Kruse CG, Maccarrone M, Wadman WJ, Werkman TR. 2012. Excitability of prefrontal cortical pyramidal neurons is modulated by activation of intracellular type-2 cannabinoid receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 109(9):3534-9.

Deniau JM, Maily P, Maurice N, Charpier S. 2007. The pars reticulata of the substantia nigra: a window to basal ganglia output. *Prog. Brain Res*. 160, 151–172.

Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. 1999. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 258(5090):1946-9.

Dhopeswarkar A, Mackie K. 2016. Functional Selectivity of CB2 Cannabinoid Receptor Ligands at a Canonical and Noncanonical Pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 358(2): 342-351.

Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L. 2004. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov*. 3(9):771-84.

Di Marzo V, Bisogno T, De Petrocellis L. 2000. Endocannabinoids: new targets for drug development. *Curr Pharm Des*. 6 (13): 1361-80.

Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, Liu J, Batkai S, Jarai Z. 2001. Leptin regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake, *Nature* 410 (6830) 822–825.

Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie K, Blond O, Lai Y, Ma AL, Mitchell RL. 1995. Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol*. 48(3):443-50.

Fernández-Ruiz J, González S, Romero J, Ramos JA. 2005. Cannabinoids in neurodegeneration and neuroprotection. En: *Cannabinoids as therapeutics*. Mechoulam R. Ed. Birkhäuser Verlag/Switzerland. Pp. 79-109.

Fernández-Ruiz JI, Romero J, Velasco G, Tolón RM, Ramos JA, Guzmán M. 2007. Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival?. *Trends Pharmacol Sci.* 28(1):39-45. Epub 2006 Dec 1.

Fernández-Ruiz J, Romero J, Velasco G, Tolón RM, Ramos JA, Guzmán M. 2007. Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival?. *Trends Pharmacol Sci.* 28(1): 39-45.

Ferré S, Baler R, Bouvier M, Caron MG, Devi LA, Durroux T, Fuxe K, George SR, Javitch JA, Lohse MJ, Mackie K, Milligan G, Pflieger KD, Pin JP, Volkow ND, Waldhoer M, Woods AS, Franco R. 2009. Building a new conceptual framework for receptor heteromers. *Nat Chem Biol.* 5(3): 131-4.

Fusco FR, Martorana A, Giampà C, De March Z, Farini D, D'Angelo V, Sancesario G, Bernardi G. 2004. Immunolocalization of CB1 receptor in rat striatal neurons: a confocal microscopy study. *Synapse.* 53(3):159-67.

Gallant M, Dufresne C, Gareau Y, Guay D, Leblanc Y, Prasit P, Labelle M. 1996. New class of potent ligands for the human peripheral cannabinoid receptor. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 6, 2263–2268.

Gaoni Y, Mechoulam, R. 1964. Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J. Am. Chem. Soc.* 86, 1646.

Gerard CM, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M. 1991. Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem J* 279:129–134.

Gerfen CR, Bolam JP. 2010. The neuroanatomical organization of the basal ganglia. In: Steiner H, Tseng K, editors. *Handbook of basal ganglia structure and function*. Amsterdam: Elsevier. pp. 3–28.

Gierschik P1. ADP-ribosylation of signal-transducing guanine nucleotide-binding proteins by pertussis toxin. *Curr Top Microbiol Immunol.* 175:69-96.

Glass M, Dragunow M, Faull RL. 1997. Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience*. 77(2):299-318.

Gong JP, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu QR, Tagliaferro PA, Brusco A, Uhl GR. 2006. Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res*. 1071(1): 10-23.

Grzelczyk A1, Gendaszewska-Darmach E. 2013. Novel bioactive glycerol-based lysophospholipids: new data -- new insight into their function. *Biochimie*. 95(4):667-79.

Hamm, H.E. 2001. How activated receptors couple to G proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 4819–4821.

Henstridge CM, Balenga NA, Schröder R, Kargl JK, Platzer W, Martini L, Arthur S, Penman J, Whistler JL, Kostenis E, Waldhoer M, Irving AJ. 2010. GPR55 ligands promote receptor coupling to multiple signalling pathways. *Br J Pharmacol*.160(3):604-14.

Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC. 1991a. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci*. 11(2):563-83.

Herkenham M, Lynn AB, de Costa BR, Richfield EK. 1991b. Neuronal localization of cannabinoid receptor in the basal ganglia. *Brain Res*. 547(2):267-74.

Hirata H, Albillos A, Fernández F, Medrano J, Jurkiewicz A, García AG. 1997. ω -Conotoxins block neurotransmission in the rat vas deferens by binding to different presynaptic sites on the N-type Ca²⁺ channel. *Eur J Pharmacol*. 321(2):217-23.

Hojo M, Sudo Y, Ando Y, Minami K, Takada M, Matsubara T, Kanaide M, Taniyama K, Sumikawa K, Uezono Y. 2008. μ -Opioid receptor forms a functional heterodimer with cannabinoid CB1 receptor: electrophysiological and FRET assay analysis. *J Pharmacol Sci*. 108(3): 308-19.

Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, and Martin BR. 2002. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 54: 161–202.

Huffman JW, Liddle J, Yu S, Aung MM, Abood ME, Wiley JL, Martin BR. 1999. 3-(1',1'-Dimethylbutyl)-1-deoxy-delta8-THC and related compounds: synthesis of selective ligands for the CB2 receptor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 7(12), 2905–2914.

Hrynevich SV, Waseem TV, Fedorovich SV. 2017. Estimation of the mitochondrial calcium pool in rat brain synaptosomes using Rhod-2 AM fluorescent dye. *Biophysics*. Volume 62, Issue 1, pp 75–78.

Huestis MA, Gorelick DA, Heishman SJ, Preston KL, Nelson RA, Moolchan ET, Frank RA. 2001. Blockade of effects of smoked marijuana by the CB1-selective cannabinoid receptor antagonist SR141716. *Arc Gen Psychiatry*. 58: 322–328.

Imperatore R1, Palomba L2, Morello G1, Spiezio AD3, Piscitelli F1, Marzo VD1, Cristino L4. 2016. Formation of OX-1R/CB1R heteromeric complexes in embryonic mouse hypothalamic cells: Effect on intracellular calcium, 2-arachidonoyl-glycerol biosynthesis and ERK phosphorylation. *Pharmacol Res*. 111:600-609.

Jastrzebska B, Fotiadis D, Jang GF, Stenkamp RE, Engel A, Palczewski K. 2006. Functional and structural characterization of rhodopsin oligomers. *J Biol Chem*. 281(17):11917-22.

Jiang LI, Collins J, Davis R, Fraser ID, Sternweis PC. 2008. Regulation of cAMP responses by the G12/13 pathway converges on adenylyl cyclase VII. *J Biol Chem* 283:23429–23439.

Jijón-Lorenzo R, Caballero-Florán IH, Recillas-Morales S, Cortés H, Avalos-Fuentes JA, Paz-Bermúdez FJ, Erlij D, Florán B. 2018. Presynaptic Dopamine D2 Receptors Modulate [3H]GABA Release at StriatoPallidal Terminals via Activation of PLC → IP3 → Calcineurin and Inhibition of AC → cAMP → PKA Signaling Cascades. *Neuroscience*; 372:74-86.

Jin W, Lo TM, Loh HH, Thayer SA. 1994. U73122 inhibits phospholipase C-dependent

calcium mobilization in neuronal cells. *Brain Res* 642(1-2):237-243.

Kaczocha M, Hermann A, Glaser ST, Bojesen IN, Deutsch DG. 2006. Anandamide uptake is consistent with rate-limited diffusion and is regulated by the degree of its hydrolysis by fatty acid amide hydrolase. *J Biol Chem*. 281(14):9066-75.

Kargl J, Balenga N, Parzmair G, Brown AJ, Heinemann A, Waldhoer M. 2012. The cannabinoid receptor CB1 modulates the signaling properties of the lysophosphatidylinositol receptor GPR55. *J. Biol. Chem*. 287, 44234–44248.

Kearn CS, 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(5):1697-704.

Khvotchev M1, Lonart G, Südhof TC. 2000. Role of calcium in neurotransmitter release evoked by alpha-latrotoxin or hypertonic sucrose. *Neuroscience*. 101(3):793-802.

Kim J, Li Y. 2014. Chronic activation of CB2 cannabinoid receptors in the hippocampus increases excitatory synaptic transmission. *J Physiol*. 593(4): 871-86.

Köfalvi A, Rodrigues RJ, Ledent C, Mackie K, Vizi ES, Cunha RA, Sperlágh B. 2005. Involvement of cannabinoid receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rodent striatum: a combined immunochemical and pharmacological analysis. *J Neurosci*. 25(11):2874-84.

Lanciego JL, Barroso-Chinea P, Rico AJ, Conte-Perales L, Callen L, Roda E, Franco R. 2011. Expression of the mRNA coding the cannabinoid receptor 2 in the pallidal complex of *Macaca fascicularis*. *Journal of Psychopharmacology*, 25, 97-104.

Lauckner JE, Jensen JB, Chen HY, Lu HC, Hille B, Mackie K. 2008. GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(7):2699–2704.

Laun AS, Shrader SH, Brown KJ, Song ZH. 2018. GPR3, GPR6, and GPR12 as novel molecular targets: their biological functions and interaction with cannabidiol. *Acta Pharmacol Sin.* doi: 10.1038/s41401-018-0031-9.

Laprairie RB1, Bagher AM2, Denovan-Wright EM3. 2017. Cannabinoid receptor ligand bias: implications in the central nervous system. *Curr Opin Pharmacol.* 32:32-43.

Li AL, Carey LM, Mackie K, Hohmann AG. 2017. Cannabinoid CB2 agonist GW405833 suppresses inflammatory and neuropathic pain through a CB1 mechanism that is independent of CB2 receptors in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 362(2), 296–305.

Li K, Fichna J, Schicho R, Saur D, Bashashati M, Mackie K, Li Y, Zimmer A, Göke B, Sharkey KA, Storr M. 2013. A role for O-1602 and G protein-coupled receptor GPR55 in the control of colonic motility in mice. *Neuropharmacology.* 71:255-63.

Lin Y, Smrcka VA. 2011. Understanding Molecular Recognition by G protein $\beta\gamma$ Subunits on the Path to Pharmacological Targeting. *Mol Pharmacol.* 80(4): 551–557.

Liu QR, Pan CH, Hishimoto A, Li CY, Xi ZX, Llorente-Berzal A, Uhl GR. 2009. Species differences in cannabinoid receptor 2 (CNR2 gene): identification of novel human and rodent CB2 isoforms, differential tissue expression and regulation by cannabinoid receptor ligands. *Genes, Brain, and Behavior*, 8(5), 519–530.

Maccarrone M, Dainese E, Oddi S. 2010. Intracellular trafficking of anandamide: new concepts for signaling. *Trends Biochem Sci.* 35(11): 601-8.

Maccarrone M, Guzmán M, Mackie K, Doherty P, Harkany T. 2014. Programming of neural cells by (endo)cannabinoids: from physiological rules to emerging therapies. *Nat Rev Neurosci.* 15(12): 786-801.

Maccarrone M. 2017. Metabolism of the Endocannabinoid Anandamide: Open Questions after 25 Years. *Front Mol Neurosci.* 2017,10:166.

Mackie K. 2008. Cannabinoid receptors: where they are and what they do. *J Neuroendocrinol.* 20 Suppl 1:10-4. doi: 10.1111/j.1365-2826.2008.01671.x.

Mailleux P, Vanderhaeghen JJ. 1992. Localization of cannabinoid receptor in the human developing and adult basal ganglia. Higher levels in the striatonigral neurons. *Neurosci Lett.* 148(1-2):173-6.

Maldonado R, Valverde O, Berrendero F. 2006. Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction, *Trends Neurosci* 29 (4) 225–232.

Martínez-Pinilla E, Reyes-Resina I, Oñatibia-Astibia A, Zamarbide M, Ricobaraza A, Navarro G, Moreno E, Dopeso-Reyes IG, Sierra S, Rico AJ, Roda E, Lanciego JL, Franco R. CB1 and GPR55 receptors are co-expressed and form heteromers in rat and monkey striatum. *Exp. Neurol.*, 2014, 261, 44-52.

Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, & Bonner TI. 1990. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature.* 346, 561–564.

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

Margeta-Mitrovic M, Jan YN, Jan LY. 2000. A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron* 27, 97–106.

Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR. 1995. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol.* 50(1):83-90.

Mechoulam R, Parker LA. 2013. The endocannabinoid system and the brain. *Annual Review of Psychology*, 64, 21–47. Meir, A., Ginsburg, S., Butkevich, A., Kachalsky, S. G., Kaiserman, I., Ahdut, R., ... Rahamimoff, R. (1999). Ion channels in presynaptic nerve terminals and control of transmitter release. *Physiological Reviews*, 79(3), 1019–1088.

Miguel BG, Calcerrada MC, Catalan RE, Martínez AM. 2001. Sphingolipid derivatives modulate intracellular Ca²⁺ in rat synaptosomes. *Acta Neurobiol. Exp.* 61, 113e117.

Misgeld U, Drew G, Yanosvky Y. 2007. Presynaptic modulation of GABA release in the basal ganglia. *Prog. Brain Res.* 160, 245–259.

Mizuno K1, Kurokawa K, Ohkuma S. 2013. Regulation of type 1 IP₃ receptor expression by dopamine D2-like receptors via AP-1 and NFATc4 activation. *Neuropharmacology.* 71:264-72.

Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. 1993. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature.* 365(6441):61-5.

Murataeva N, Straiker A, Mackie K. 2014. Parsing the players: 2-arachidonoylglycerol synthesis and degradation in the CNS. *Br J Pharmacol.* 171(6):1379-91

Nava-Asbell C, Paz-Bermudez F, Erlij D, Aceves J, Florán B. 2007. GABA(B) receptor activation inhibits dopamine D1 receptor-mediated facilitation of [(3)H]GABA release in substantia nigra pars reticulata. *Neuropharmacology.* 53(5):631-7

Nicolussi S, Viveros-Paredes JM, Gachet MS, Rau M, Flores-Soto ME, Blunder M, Gertesch J. 2014. Guineensine is a novel inhibitor of endocannabinoid uptake showing cannabimimetic behavioral effects in BALB/c mice. *Pharmacol Res.* 80: 52-65.

Oddi S, Fezza F, Pasquariello N, De Simone C, Rapino C, Dainese E, Finazzi-Agrò A, Maccarrone M. 2008. Evidence for the intracellular accumulation of anandamide in adiposomes. *Cell Mol Life Sci.* 65(5):840-50.

Oertel WH, Schmechel DE, Brownstein MJ, Tappaz ML, Ransom DH, Kopin IJ. 1981. Decrease of glutamate decarboxylase (GAD)-immunoreactive nerve terminals in the substantia nigra after kainic acid lesion of the striatum. *J Histochem Cytochem.* 29(8):977-80.

Onaivi ES. 2011. Commentary: Functional Neuronal CB2 Cannabinoid Receptors in the CNS. *Curr Neuropharmacol.* 9(1): 205–208.

Oka S, Nakajima K, Yamashita A, Kishimoto S, Sugiura T. 2007. Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 362(4):928-34.

Oka S, Toshida T, Maruyama K, Nakajima K, Yamashita A, Sugiura T. 2009. 2-Arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphoinositol: a possible natural ligand for GPR55. *J Biochem.* 145(1):13-20.

Penumarti A, Abdel-Rahman AA. 2014. The Novel Endocannabinoid Receptor GPR18 Is Expressed in the Rostral Ventrolateral Medulla and Exerts Tonic Restraining Influence on Blood Pressure. *J Pharmacol Exp Ther.* 349(1): 29–38.

Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, Alexander SP, Di Marzo V, Elphick MR, Greasley PJ, Hansen HS, Kunos G, Mackie K, Mechoulam R, Ross RA. 2010. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB1 and CB2. *Pharmacol Rev.* 62(4): 588-631.

Pertwee RG. 2005. The therapeutic potential of drugs that target cannabinoid receptors or modulate the tissue levels or actions of endocannabinoids. *AAPS J.* 7(3): E625-54.

Pietr M1, Kozela E, Levy R, Rimmerman N, Lin YH, Stella N, Vogel Z, Juknat A. 2009. Differential changes in GPR55 during microglial cell activation. *FEBS Lett.* 583(12):2071-6.

Piñeiro R, Maffucci T, Falasca M. 2011. The putative cannabinoid receptor GPR55 defines a novel autocrine loop in cancer cell proliferation. *Oncogene.* 30(2):142-52.

Piomelli D, Beltramo M, Glasnapp S, Lin SY, Goutopoulos A, Xie XQ, Makriyannis A. 1999. Structural determinants for recognition and translocation by the anandamide transporter. *Proc Natl Acad Sci.* 11;96(10):5802-7.

Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci.* 2003; 4(11): 873-74

Pistis, M. and Melis, M. 2010. From surface to nuclear receptors: the endocannabinoid family extends its assets. *Curr. Med. Chem.* 17, 1450–1467.

Qian WJ, Yin N, Gao F, Miao Y, Li Q, Li F, Wang Z. 2017. Cannabinoid CB1 and CB2 receptors differentially modulate L- and T-type Ca²⁺ channels in rat retinal ganglion cells. *Neuropharmacology*, 124, 143–156.

Qi-xin Shi, Liu-kun Yang, Wen-long Shi, Lu Wang, Shi-meng Zhou, Shao-yu Guan, Ming-gao Zhao and Qi Yang. 2017. The novel cannabinoid receptor GPR55 mediates anxiolytic-like effects in the medial orbital cortex of mice with acute stress. *Mol Brain*. 2017; 10: 38.

Rashid AJ, So CH, Kong MM, Furtak T, El-Ghundi M, Cheng R, O'Dowd BF, George SR. 2007. D1-D2dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104:654–9.

Rios CD, Jordan BA, Gomes I, Devi LA. 2001. G-protein-coupled receptor dimerization: modulation of receptor function. *Pharmacol Ther*. 92:71–87.

Robinson Rowan. 1999. *El Gran Libro del Cannabis*. Lasser Press Mexicana

Rosales MG, Martinez-Fong D, Morales R, Nuñez A, Flores G, Góngora-Alfaro JL, Flóran B, Aceves J. 1997. Reciprocal interaction between glutamate and dopamine in the pars reticulata of the rat substantia nigra: a microdialysis study. *Neuroscience*. 80(3):803-10.

Russo EB, Burnett A, Hall B, Parker KK. 2005. Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT1a receptors. *Neurochem Res*. 30(8):1037-43

Ryberg E, Larsson N, Sjogren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ. 2007. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*. 152(7):1092–1101.

Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ. 2007. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*. 152(7): 1092-101.

Sagar DR, Kelly S, Millns PJ, O'Shaughnessey CT, Kendall DA, Chapman V. 2005. Inhibitory effects of CB1 and CB2 receptor agonists on responses of DRG neurons and dorsal horn neurons in neuropathic rats. *Eur J Neurosci*. 22(2): 371-9.

Sagredo O, Gonzalez S, Arroyo I, Pazos MR, Benito C, Lastres-Becker I, Romero JP, Tolon RM, Mechoulam R, Brouillet E, Romero J, Fernandez-Ruiz JJ. 2009. Cannabinoid CB2 receptor agonists protect the striatum against malonate toxicity: relevance for Huntington's disease. *Glia* 57:1154–1167

Sanchez AJ, Garcia-Merino A. 2012. Neuroprotective agents: cannabinoids. *Clin Immunol* 142 (1) 57–67.

Sánchez-Zavaleta R. 2013. Tesis de Maestría: Vía de señalización del receptor CB2 en el control de la liberación de [³H]-glutamato en la sustancia negra reticulada de rata.

Sawzdargo M, Nguyen T, Lee DK, Lynch KR, Cheng R, Heng HH, George SR, O'Dowd BF. 1999. Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, PsiGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Brain Res Mol Brain Res*. 64(2): 193-8.

Schuelert N1, McDougall JJ. 2011. The abnormal cannabidiol analogue O-1602 reduces nociception in a rat model of acute arthritis via the putative cannabinoid receptor GPR55. *Neurosci Lett*. 500(1): 72-6.

Sierra S, Luquin N, Rico AJ, Gomez-Bautista V, Roda E, Dopeso-Reyes IG, Lanciego JL. 2015. Detection of cannabinoid receptors CB1 and CB2 within basal ganglia output neurons in macaques: Changes following experimental parkinsonism. *Brain Structure & Function*, 220, 2721-2738.

Smith Y, Bolam JP, 1989. Neurons of the substantia nigra reticulata receive a dense GABA-containing input from the globus pallidus in the rat. *Brain Res*. 493, 160–167.

Starowicz K, Nigam S, Di Marzo V. 2007. Biochemistry and pharmacology of endovanilloids. *Pharmacol Ther* 114: 13–33.

Staton PC, Hatcher JP, Walker DJ, Morrison AD, Shapland EM, Hughes JP, Chong E, Mander PK, Green PJ, Billinton A, Fulleylove M, Lancaster HC, Smith JC, Bailey LT, Wise A, Brown AJ, Richardson JC, Chessell IP. 2008. The putative cannabinoid receptor GPR55 plays a role in mechanical hyperalgesia associated with inflammatory and neuropathic pain. *Pain*. 139(1):225-36.

Stella N, Schweitzer P, Piomelli D. 1997. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* 388 (6644) 773–778.

Sun Y, Alexander SP, Garle MJ, Gibson CL, Hewitt K, Murphy SP, Kendall DA, Bennett AJ. 2007. Cannabinoid activation of PPAR alpha; a novel neuroprotective mechanism. *Br J Pharmacol*. 152(5): 734-43.

Sylantsev S, Jensen TP, Ross RA, Rusakov DA. 2013. Cannabinoid- and lysophosphatidylinositol-sensitive receptor GPR55 boosts neurotransmitter release at central synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110(13):5193-8.

Teramoto T, Niidome T, Miyagawa T, Nishizawa Y, Katayama K, Sawada K. 1995. Two types of calcium channels sensitive to omega-agatoxin- TK in cultured rat hippocampal neurones. *Neuroreport*. 6(12):1684-8.

Thastrup O, Cullen PJ, Drobak BK, Hanley MR, Dawson AP. 1990. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(7):2466-70.

Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, Stella N, Makriyannis A, Piomelli D, Davison JS, Marnett LJ, Di Marzo V, Pittman QJ, Patel KD, Sharkey KA. 2005. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science*. 310(5746): 329-32.

Wise LE, Thorpe A, Lichtman AH. 2009. Hippocampal CB1 receptors mediate the memory impairing effects of Δ9-Tetrahydrocannabinol. *Neuropsychopharmacology* 34, 2072–2080

Xi ZX, Peng XQ, Li X, Song R, Zhang HY, Liu QR, Yang HJ, Bi GH, Li J, Gardner EL. 2011. Brain cannabinoid CB2 receptors modulate cocaine's actions in mice. *Nat Neurosci.* 14(9): 1160-6.

Xie XQ1, Chen JZ, Billings EM. 2003. 3D structural model of the G-protein-coupled cannabinoid CB2 receptor. *Proteins.* 53(2):307-19.

Yang H, Zhou J, Lehmann C. 2016. GPR55 - a putative "type 3" cannabinoid receptor in inflammation. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 27(3): 297-302.

Zhang HY, Gao M, Liu QR, Bi GH, Li X, Yang HJ, Xi ZX. 2014. Cannabinoid CB2 receptors modulate midbrain dopamine neuronal activity and dopamine-related behavior in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 111(46), E5007–5015.

Zhang HY, Gao M, Shen H, Bi GH, Yang HJ, Liu QR, Wu J, Gardner EL, Bonci A, Xi ZX. 2017. Expression of functional cannabinoid CB2 receptor in VTA dopamine neurons in rats. *Addict Biol.* 22(3):752-765.

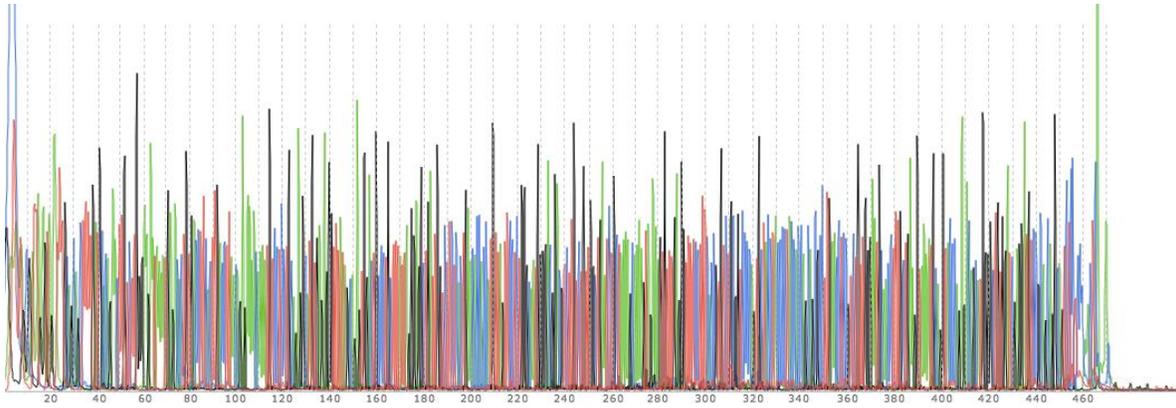
Zuardi, AW. 2006. History of cannabis as a medicine: a review. *Rev Bras. Psiquiatr.* 28(2):153-7.

12. ANEXOS

Anexo 1. Secuenciación del producto de amplificación

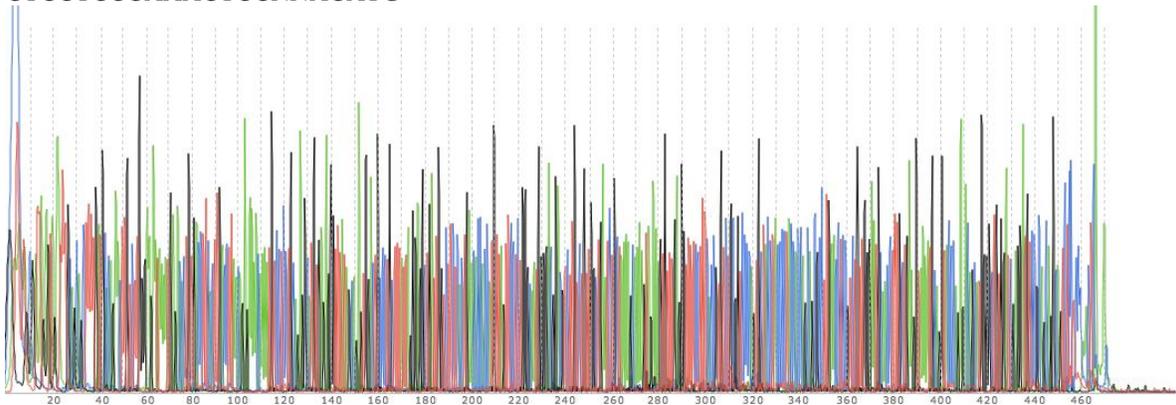
Forward:

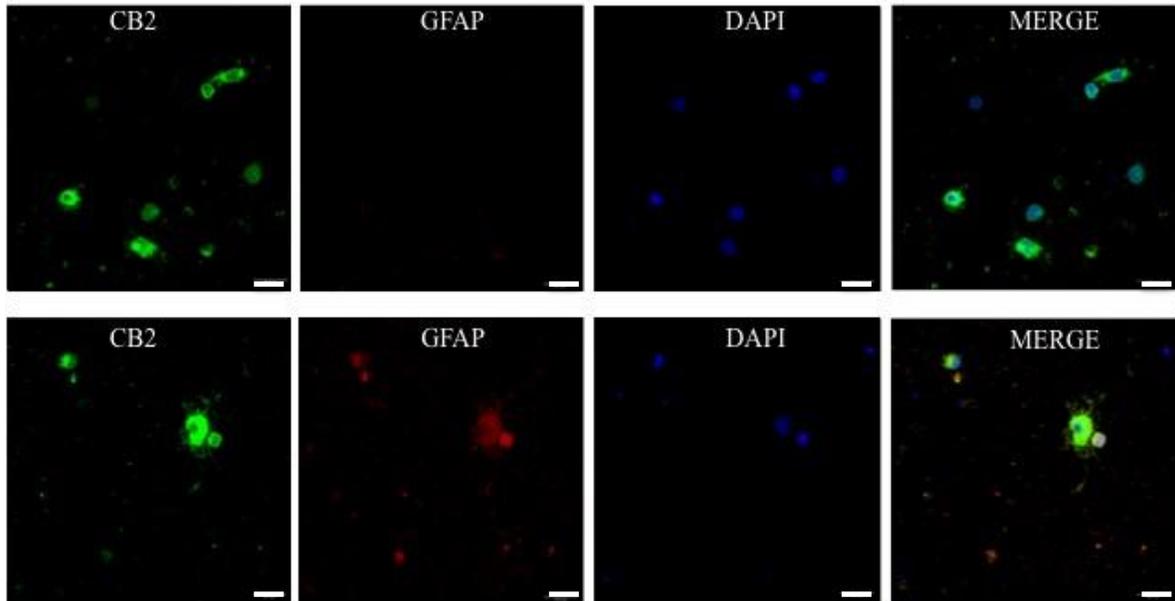
NNNNNNNNNCAGCCCATGCTGTCTCTGGGTACCTGCATTTTACCTTCAGCAAAGGTTGC
ATCCCAACAGACGGAGGTTCAAGGCGCTGCTGGTGGTAGGGGTAGGTAGCACTGGGG
ACCGCAGACACGGTGAAAGGAAAACCCTCAAACACTTTCTACTTTTGTCTTTTAGCAGAT
TCAGCCAACAGACAAGACGTCCGTCCCCATTGCCAGAGGAACTAACATGGTGGTGT
CAGTGAGAAGACCAATCAGCCTCCCTAATAAAGCAGGGCAGTCCACTCTGCTATAAAC
CCTCTCACATGCCTCTGCAGGAGGACATTTTGTCTCTGTTAAGGTCAAGTGAAGGT
CACAGTGTCTCATTTTATTCTTCCCAAGACAAGTTCTGTGCATCAAAGCTGCTGCAA
TTCTACTCTAATCGCTATGTGGGAGGACTCGGGGAAGAAGTTGATTCGTCTGGACGAA
GGG



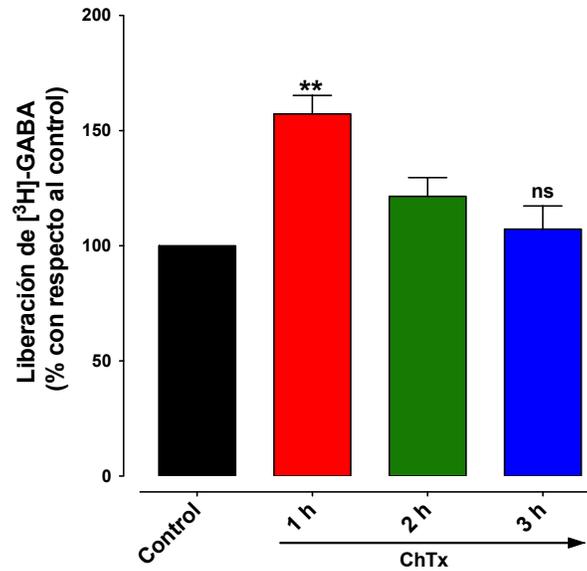
Reverse:

NNNNNNNNCGATTAGAGTAGATTTGCAGCAGCTTTTGATGCACAGAACTTGTCTTGGGAAGAAT
AAAATGAGACTGTGACCTTCACTTGACCTTAACAGAGAAAACAAAATGTCCTCCTGCAGAGG
CATGTGAGAGGGTTTATAGCAGAGTGGACTGCCCTGCTTTATTAGGGAGGCTGATTGGTCTTCTC
ACTGAACACCACCATGTTAGTTCTCTGGGCAATGGGGACGGACGTCTTGTCTGTTGGCTGAATC
TGCTAAAAGCAAAGTAGAAAGTGTGGAGGGTTTTCTTTACCGTGTCTGCGGTCCCAAGTGC
TACCTACCCCTACCACCAGCAGCGCCTTGAACCTCCGTCTGTTGGGAATGCAACCTTTGCTGAAG
GTAAAATGCAGGTACCCAGAGACAGCATGGGGCTGTGGATCGAGGATGTCCGCAGCAGGCAGT
CTCTCCCAAACCTCCNNACATG





Anexo 2. Expresión escasa del receptor CB2 en astrocitos. Fotomicrografías de cultivos neuronales primarios del núcleo subtalámico obtenidas por inmunofluorescencia. En el panel superior se observa la expresión del receptor CB2 (verde) en células no positivas a la proteína acídica fibrilar de la glía (GFAP). En el panel inferior se muestra uno de los 7 campos ópticos donde se encontró co-localización del receptor CB2 con GFAP (rojo). En azul se observa la tinción de núcleos celulares con DAPI. Barra de escala: 10 μ m.



Anexo 3. La toxina colérica estimula la liberación de [3H]GABA inducida por potasio. Curso temporal de la liberación de [3H]GABA en rebanadas de la SNr después de la incubación con toxina colérica (ChTx, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) durante 1, 2 ó 3 horas, la ChTx aumenta la liberación de [3H]GABA, éste efecto es dependiente del tiempo y después de 3 horas no hay diferencia significativa con respecto al control. Se representa la media aritmética del área bajo la curva + ESM. $n=3$ experimentos, 4 replicas en cada uno. ANOVA de una vía y Tukey post-test, ** $p<0.01$ con respecto al control, ns: sin diferencia significativa.