

**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS
ÁREA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
LABORATORIO DE NEUROFARMACOLOGÍA**

TESIS DOCTORAL

***Estudio de los receptores a cannabinoides CB1 y GPR55 sobre la
captura de GABA en el Globo Pálido externo y sus efectos en la
actividad motora de ratas***

**PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS QUÍMICAS EN EL
ÁREA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**PRESENTA
M.C. MARÍA DE GUADALUPE MUÑOZ ARENAS**

DIRECTORES DE TESIS

**D.C. ILHUICAMINA DANIEL LIMÓN PÉREZ DE LEÓN
LABORATORIO DE NEUROFARMACOLOGÍA, FCQ-BUAP**

**D.C. BENJAMÍN FLORAN GARDUÑO
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS
CINVESTAV-IPN**

16 de Diciembre de 2014

RESUMEN

Las vías directa e indirecta de los ganglios basales (GB), tienen como función, la activación e inhibición del movimiento respectivamente, lo cual se traduce en la fina regulación de los programas motores. La vía indirecta de los GB se forma por neuronas espinosas medianas (NEM) que provienen del estriado y proyectan hacia el globo pálido externo (GPe); la naturaleza de estas neuronas es GABAérgica, por tanto, su activación conllevará a la inhibición de las funciones del GPe, que permitirá la activación de los núcleos de salida de los GB (SNr/GPi), trayendo como consecuencia la inhibición del movimiento.

La concentración de GABA en el espacio sináptico es regulada por los transportadores de GABA (GATs), de los cuales, el 1 y el 3 se localizan de manera importante en el GPe. Asimismo, se ha demostrado que la actividad de los GATs, es regulada por la activación de los receptores a cannabinoides. Por tal motivo, el objetivo de este trabajo fue estudiar la función de los receptores CB1 y GPR55, sobre la actividad de los GAT-1 y 3 en el GPe de ratas intactas y estudiar las consecuencias motoras que conlleva su activación en el mismo núcleo.

Se cuantificó la captura de [³H]GABA después de activar a los receptores CB1 y GPR55 en sinaptosomas (terminales nerviosas) y gliosomas (astrocitos aislados) de GPe de ratas intactas y se encontró que dicha activación, inhibe a los GAT-1 y 3 en astrocitos y en terminales nerviosas respectivamente. Por otro lado, la administración intrapalidal de los agonistas de los receptores CB1 y GPR55, disminuyó de manera significativa la actividad motora de ratas intactas; de la misma forma que el bloqueo de los GATs 1 y 3 palidales, disminuyó la actividad motora.

Debido a los resultados neuroquímicos obtenidos, se propone que los receptores a cannabinoides, disminuyen la actividad motora por el bloqueo de los GATs 1 y 3 del GPe. Este bloqueo, producirá un incremento de GABA en el GPe, lo que llevará a la sobreactivación de la vía indirecta de los GB, lo cual explica la disminución motora observada.

Estudio de los receptores a cannabinoides CB1 y GPR55 sobre la captura de GABA en el Globo Pálido externo y sus efectos en la actividad motora de ratas

El presente estudio, muestra la importancia del sistema endocanabinoide y de los GATs en la regulación de los GB y propone a dichas proteínas como un blanco terapéutico importante en el tratamiento de las diversas enfermedades de los GB.

ABSTRACT

Basal ganglia (BG) function is based in the fine regulation of the direct and indirect pathways, which activate and inhibit the movement respectively. Indirect pathway of BG is formed by medium spiny neurons (MSN) which coming from the striatum and project to the external globus pallidus (GPe); these GABAergic neurons inhibit GPe functions, which allow the activation of the output nuclei of BG (SNr/GPi), consequently resulting in inhibition of movement.

GABA concentration in the synaptic cleft is regulated by GABA transporters (GATs), which 1 and 3 are located substantially in the GPe. In addition, it has been shown that the activity of GATs, is regulated by the activation of cannabinoid receptors. Therefore, the aim of this work was to study the role of CB1 and GPR55 receptors on the activity of GAT-1 and 3 in the GPe of intact rats and to study the consequences associated with their activation in the motor activity.

[³H]GABA uptake measured after activating the CB1 and GPR55 receptors in synaptosomes (nerve terminals) and gliosomes (isolated astrocytes) from GPe of intact rats. We showed that CB1 receptors activation inhibits [³H]GABA uptake mediated by GAT-3 in astrocytes, while GPR55 activation, inhibits [³H]GABA uptake mediated by GAT-1 in nerve terminals of GPe. Moreover, intrapallidal administration of CB1 and GPR55 receptors agonists' significantly decreased motor activity in intact rats; also, GAT-1 and 3 blockade mediates low motor activity too.

Because neurochemical findings on CB1 and GPR55 receptors, we can propose that cannabinoid receptors activation, blocks GATs 1 and 3 in the GPe. This blockade will produce an increase of GABA release in the GPe, leading to overactivation of the indirect pathway of BG, which explains the decrease in motor activity.

This study shows the importance of the endocannabinoid system and GATs in BG regulating such proteins and proposes as an important therapeutic target in the treatment of BG diseases.

ÍNDICE

1	ABREVIATURAS	1
2	LISTA DE GRÁFICAS Y FIGURAS	5
3	LISTA DE TABLAS	7
4	INTRODUCCIÓN	8
4.1	El sistema GABAérgico	8
4.1.1	Síntesis, acción y degradación del GABA	8
4.1.2	La captura de GABA, es mediada por los transportadores de GABA.....	17
4.2	El circuito de los ganglios basales	24
4.2.1	Conformación del estriado.....	26
4.2.2	Estructura del globo pálido externo y del núcleo subtalámico	28
4.2.3	Estructura de la sustancia nigra reticulada y del globo pálido interno	29
4.2.4	Funcionamiento de los ganglios basales	30
4.2.5	Papel de la dopamina sobre el funcionamiento de los ganglios basales	31
4.3	El sistema endocanabinoide como modulador del sistema nervioso central ..	35
4.3.1	Papel de los receptores CB1 en los ganglios basales	38
4.3.2	El receptor GPR55 como posible modulador de la neurotransmisión en el sistema nervioso central	44
5	JUSTIFICACIÓN	49
6	HIPÓTESIS	50
7	OBJETIVO GENERAL	50
7.1	OBJETIVOS PARTICULARES	50
8	METODOLOGÍA	51
8.1	Diagrama general de trabajo	51
8.2	Fármacos de estudio	51
8.3	Sujetos de experimentación	52
8.4	Obtención de las estructuras de estudio.....	52
8.4.1	Obtención de sinaptosomas de globo pálido externo de ratas	52
8.4.2	Obtención de gliosomas de GPe	53
8.5	Estudios neuroquímicos	54

8.5.1	Captura de [³ H]GABA en sinaptosomas y gliosomas de globo pálido externo de ratas.....	55
8.6	Estudios bioquímicos.....	56
8.6.1	Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	56
8.6.2	Detección de proteínas por Western blot.....	57
8.7	Cirugía estereotáxica.....	60
8.7.1	Implante de cánula en el GPe de ratas intactas	60
8.8	Estudios conductuales.....	61
8.8.1	Evaluación de la conducta de motora en campo cerrado.....	61
8.8.2	Evaluación de la conducta motora en el modelo de campo abierto.....	62
9	RESULTADOS	64
9.1	Participación del GAT-1 y GAT-3 sobre la captura de GABA en el globo pálido externo de ratas intactas.....	65
9.2	Efecto de la activación de los receptores CB1 y GPR55, sobre la captura de GABA en el globo pálido externo de ratas intactas.....	69
9.3	Participación de las vías adenilil ciclasa-PKA y PLC-PKC, sobre la captura de GABA en el globo pálido externo de ratas intactas.....	75
9.4	Efecto de la activación de los receptores CB1 y GPR55 sobre la actividad motora de ratas intactas.	78
10	DISCUSIÓN	87
11	CONCLUSIONES	98
12	PERSPECTIVAS	98
13	BIBLIOGRAFÍA	99
14	APÉNDICES	113

1 ABREVIATURAS

Ac: Adenilil ciclasa

ACh: Acetilcolina

ACEA: Araquidonil-2'-cloroetilamida

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

AEA: N-araquidonil etanolamida o anandamida

2-AG: 2-araquidonilglicerol

AMPc: Adenosil monofosfato cíclico

AM251: 1-(2,4-Dichlorofenil)-5-(4-iodofenil)-4-metil-N-1-piperidinil-1H-pirazol-3-carboxamida

AM404: N-(4-Hidroxifenil)-araquidonilamida

AP: Anteroposterior

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

BGT-1: Transportador de GABA y betaína-1

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

8-Br-AMPc: 8-Bromo-Adenosil Monofosfato cíclico

BSA: Albúmina sérica de bovino

CaMKII α : Proteína cinasa II α dependiente de calcio/calmodulina

ChAT: Colina acetil transferasa

COX-2: Cicloxigenasa-2

CP55940: 5-(1,1-Dimetilheptil)-2-[5-hidroxi-2-(3-hidroxiopropil)ciclohexil]fenol

DA: Dopamina

DAG: Diacilglicerol

DARPP-32: Fosfoproteína de 32 kDa dependiente de dopamina y AMPc

DPM: Desintegraciones por minuto

ERK: Cinasa regulada de forma extracelular

ESI-MS: Espectrofotometría de masas por electrospray de ionización

ESM: Error estándar de la media

FAAH: Amido hidrolasa de los ácidos grasos

FSK: Forskolina

GABA: Ácido γ -amino butírico

GABA-T: GABA transaminasa

GAD: Glutamato descarboxilasa

GAT: Transportador de GABA

GB: Ganglios basales

GFAP: Proteína ácida fibrilar de la glia

Gö6983: 3-[1-[3-(Dimetilamino)propil]-5-metoxi-1H-indol-3-il]-4-(1H-indol-3-il)-1H-pirrol-2,5-diona

GPCR: Receptores acoplados a proteínas G

GPe: Globo pálido externo

GPI: Globo pálido interno

HEK-293: Células de riñón humano

HEPES: Sal de sodio ácido 4-(2-Hydroxletil)piperazina-1-etanesulfónico, N-(2-Hidroxietyl)piperazina-N'-(ácido 2-etanesulfónico)

HTG: High Throughput Genome (Genoma de alto rendimiento)

IP₃: 1, 4, 5-trifosfato de inositol

IT: Intratelencefálico

JWH015: (2-Metil-1-propil-1H-indol-3-il)-1-naftalenilmetanona

K-H: Krebs-henseleit

L: Lateralidad

LPI: Lisofosfatidilinositol

MAGL: Monoacilglicerol lipasa

MAPK: Proteínas cinasas activadas por mitógeno

MEA: Metanandamida

NADA: N-araquidonildopamina

NAPE: N-palmitoiletanolamida

NCBI: National Center for Biotechnology Information (centro nacional de información biotecnológica)

NEM: Neurona espinosa mediana

NO: Óxido nítrico

NRC: National Research Council (consejo nacional de investigación)

NST: Núcleo subtalámico

P: Profundidad

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PG: Proteína G

PG_{io}: Proteína G inhibidora de adenilil ciclasa

PG_{q/11}: Proteína G estimuladora de fosfolipasa C

PG_{s/olf}: Proteína G estimuladora de adenilil ciclasa

PI3K: Fosfatidilinositol 3 cinasa

PKA: Proteína cinasa dependiente de AMPc

PKC: Proteína cinasa C

PLC: Fosfolipasa C

PLP: Fosfato de 5'-piridoxal

PMA: 12-miristato-13-acetato

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PP-1: Proteína fosfatasa 1

PT: Tracto piramidal

RGS: Reguladores de la señalización de proteínas G

RIPA: Buffer de lisis (de Radio-Immunoprecipitation Assay)

SKF89976A: Ácido 1-(4,4-Difenil-3-butenil)-3-piperidinecarboxílico

SLC6: Solute carrier gene family (familia de genes de transportadores de solutos)

SNAP5114: Ácido (S)-1-[2-[Tris(4-metoxifenil)metoxi]etil]-3-piperidinecarboxílico

SNc: Sustancia *nigra pars compacta*

SNC: Sistema Nervioso Central

SNP: Sistema Nervioso Periférico

SNr: Sustancia *nigra pars reticulata*

SR141716A: Hidrocloruro de *N*-(Piperidin-1-il)-5-(4-chlorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxamida

SSADH: Semialdehído deshidrogenasa

TGI: Tracto gastrointestinal

TH: Tirosina hidroxilasa

Δ^8 -THC: Δ^8 - tetrahidrocanabinol

Δ^9 -THC: Δ^9 - tetrahidrocanabinol

7TM: Siete dominios transmembranales

TPA: 12-tetradecanoil-13-acetato

vGAT: Transportador vesicular de GABA

VTA: Área ventral tegmental

WIN55212-2: Mesilato de (R)-(+)-[2,3-Dihidro-5-metil-3-(4-morfolinilmetil)pirrolo[1,2,3-*de*]-1,4-benzoxazin-6-il]-1-naftalenilmetanona

2 LISTA DE GRÁFICAS Y FIGURAS

1 La derivación del GABA.	9
2 Regulación de la síntesis de GABA.....	10
3 Representación de la estructura tridimensional de GAD 65 y 67.	11
4 Representación esquemática del receptor GABAA.....	13
5 Estructura del receptor GABAB y sus efectores intracelulares.....	14
6 Estructura del receptor GABAC.....	16
7 Conformación del sistema GABAérgico.	17
8 Modelo teórico de GAT-1.	19
9 Efecto de la activación de las proteínas cinasas C y A sobre la captura de GABA.21	
10 Modelo topológico de GAT-2.....	23
11 Neuronas glutamatérgicas cortico-estriatales de tipo intratelencefálica (IT) y del tracto piramidal (PT).	25
12 Neuronas espinosas medianas estriatales.	27
13 Interneuronas estriatales.....	28
14 Circuito de los ganglios basales.	31
15 ARN mensajero de los cinco receptores dopaminérgicos en el estriado.....	33
16 Efecto de la activación de los receptores D1 y D2 sobre la liberación de GABA en los ganglios basales.....	35
17 Expresión de los receptores CB1 en el cerebro de rata.	38
18 La activación de los receptores CB1, regula la neurotransmisión del SNC.....	39
19 Localización inmunocitoquímica de GFAP y de los receptores CB1 en astrocitos de la región CA1 del hipocampo de ratón.....	42
20 Fotomicrografía de un sinaptosoma de globo pálido externo de rata.	53
21 Expresión de GFAP en Gliosomas de globo pálido externo de rata.....	54
22 Metodología para medir la captura de [3H]GABA en sinaptosomas y gliosomas de GPe de ratas intactas.	56
23 Pasos realizados para la detección de los receptores CB1 y GPR55 en proteína de sinaptosomas y gliosomas de globo pálido externo de ratas.....	60
24 Cajas de actividad motora.	62

25 Modelo de campo abierto.....	63
26 Captura de GABA en rebanadas de globo pálido externo de ratas intactas.....	65
27 Captura de GABA en gliosomas y sinaptosomas de globo pálido externo de ratas intactas.	68
28 Expresión de los receptores CB1 y GPR55 en el globo pálido externo de ratas..	71
29 Efecto de la activación de los receptores CB1 y GPR55, sobre la captura de GABA en gliosomas y sinaptosomas de globo pálido externo de ratas intactas.	74
30 Efecto de la activación de la adenilil ciclasa y de la PKA, sobre la captura de GABA en sinaptosomas de globo pálido externo de ratas intactas.....	76
31 Papel de la PKC, sobre la captura de GABA en sinaptosomas de globo pálido externo de ratas intactas.....	77
32 Actividad motora en campo cerrado.....	80
33 Actividad motora en campo abierto.....	84
34 Esquema hipotético final.	97

3 LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Curva de calibración para la obtención de proteínas por el método de Bradford_____	57
Tabla 2 Anticuerpos primarios utilizados para el reconocimiento de proteínas____	59
Tabla 3 Anticuerpos secundarios utilizados para la visualización de proteínas____	59
Tabla 4 Captura de GABA después del bloqueo del GAT-1 y GAT-3 en sinaptosomas y gliosomas de GPe. _____	69
Tabla 5 Captura de GABA después de modificaciones fisiológicas y farmacológicas en gliosomas y sinaptosomas de GPe de ratas intactas. _____	69
Tabla 6 Inhibición de la captura de GABA por agonistas del receptor CB1 y GPR55 _____	75
Tabla 7 Captura de GABA mediada por diferentes fármacos en el globo pálido externo _____	75
Tabla 8 Efecto de la activación de la PKA sobre la captura de GABA en sinaptosomas de GPe _____	76
Tabla 9 Efecto de la PKC sobre la captura de GABA en sinaptosomas de GPe ____	77
Tabla 10 Movimientos en el modelo de campo cerrado después de la administración intrapalidal de agonistas CB1 y GPR55 _____	81
Tabla 11 Desplazamientos en el modelo de campo cerrado después de la administración intrapalidal de agonistas CB1 y GPR55 _____	81
Tabla 12 Cuadros visitados en el campo abierto después de la administración intrapalidal de agonistas CB1 y GPR55 _____	85
Tabla 13 Número de erguidos en el campo abierto después de la administración intrapalidal de agonistas CB1 y GPR55 _____	85
Tabla 14 Número de torsiones en el campo abierto después de la administración intrapalidal de agonistas y antagonistas CB1 y GPR55 _____	86

4 INTRODUCCIÓN

4.1 El sistema GABAérgico

El ácido γ -aminobutírico, mejor conocido como GABA, es el principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos y se encuentra involucrado de manera directa o indirecta en la mayoría de las funciones cerebrales como procesos cognitivos, neurogénicos, motores y de desarrollo (Olsen y Betz, 2006); se trata de una molécula pequeña, de 103 Da, cuya concentración en el SNC oscila en rango milimolar (Johnston, 2006).

A partir de 1950 y hasta 1965, diversos estudios demostraron que el GABA es una sustancia abundante en el SNC, pero que también cumplía con parámetros imprescindibles para considerarlo un neurotransmisor

1. Se encuentra presente en terminales nerviosas.
2. Se libera al espacio sináptico a través de estímulos eléctricos.
3. Cuenta con mecanismos especializados en la terminación de su acción en el espacio sináptico.
4. Existen en la postsinapsis, receptores específicos para su acción.
5. desencadena eventos inhibitorios tanto en el SNC como en modelos aislados.

Debido a este importante descubrimiento, ahora se habla del *sistema GABAérgico*, el cual se encuentra conformado por el neurotransmisor GABA, las proteínas de síntesis denominadas glutamato descarboxilasa ($GAD_{65/67}$), los transportadores vesiculares (vGAT), los diferentes receptores transmembranales ($GABA_A$, $GABA_B$, $GABA_C$), los transportadores presinápticos que internalizan al GABA ($GAT-1$, 2 y 3, BGT-1) y la proteína de degradación conocida como GABA transaminasa (GABA-T) (Borden, 1996).

4.1.1 Síntesis, acción y degradación del GABA

El GABA se sintetiza *in vivo*, a partir de un mecanismo que se conoce como “shunt” o derivación del GABA (fig. 1), el cual es un mecanismo cerrado que tiene como finalidad la producción y almacenamiento del GABA. La glucosa es el principal

precursor del GABA *in vivo*, asimismo, el piruvato y otros aminoácidos, pueden participar como precursores.

El primer paso en el “shunt” de GABA, es la transaminación del α -cetoglutarato (que se forma a partir del metabolismo de la glucosa en el ciclo de Krebs) por la GABA: α -cetoglutarato transaminasa (GABA-T), lo cual forma ácido L-glutámico (Martin y Olsen, 2000). Una vez realizado este evento, la GAD cataliza la descarboxilación del ácido glutámico, evento que permite a formación de GABA.

El GABA se metaboliza por GABA-T para formar semialdehído succínico, el cual puede ser oxidado por la succínico semialdehído deshidrogenasa (SSADH) para formar ácido succínico, producto que puede ingresar nuevamente al ciclo de Krebs.

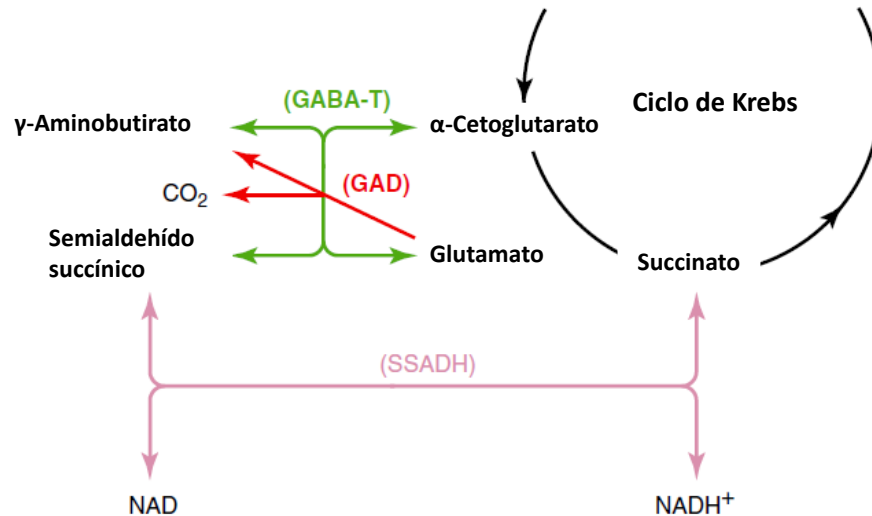


Fig.1. La derivación del GABA. GAD produce GABA y CO_2 a partir de glutamato (flechas rojas). GABA-T metaboliza el GABA y forma semialdehído succínico (SSA) que posteriormente forma glutamato. SSA es oxidado por NAD y la SSA deshidrogenasa (flechas rosas) a NADH^+ y succinato, el cual reingresa al ciclo de Krebs (Tomado y modificado de Olsen y Betz, 2006).

El paso limitante para la síntesis del GABA, es la descarboxilación del glutamato, reacción que es catalizada por la GAD, cuya actividad es regulada por la concentración de fosfato de piridoxal, el cual, permite la interconversión entre la forma inactiva (apo-GAD) y la activa (holo-GAD) (Martin y Tobin, 2000); mientras que los moduladores negativos de esta enzima, son el GABA, ATP y aspartato (Petroff, 2002).

aminoácidos, mientras que el ADNc para GAD₆₇ codifica un polipéptido de 67000 Daltones compuesto de 594 aminoácidos. Además de tener secuencias y pesos moleculares distintos, estas dos proteínas difieren en su patrón de expresión, distribución intracelular y en su interacción con el fosfato de piridoxal (Erlander y Tobin., 1991).

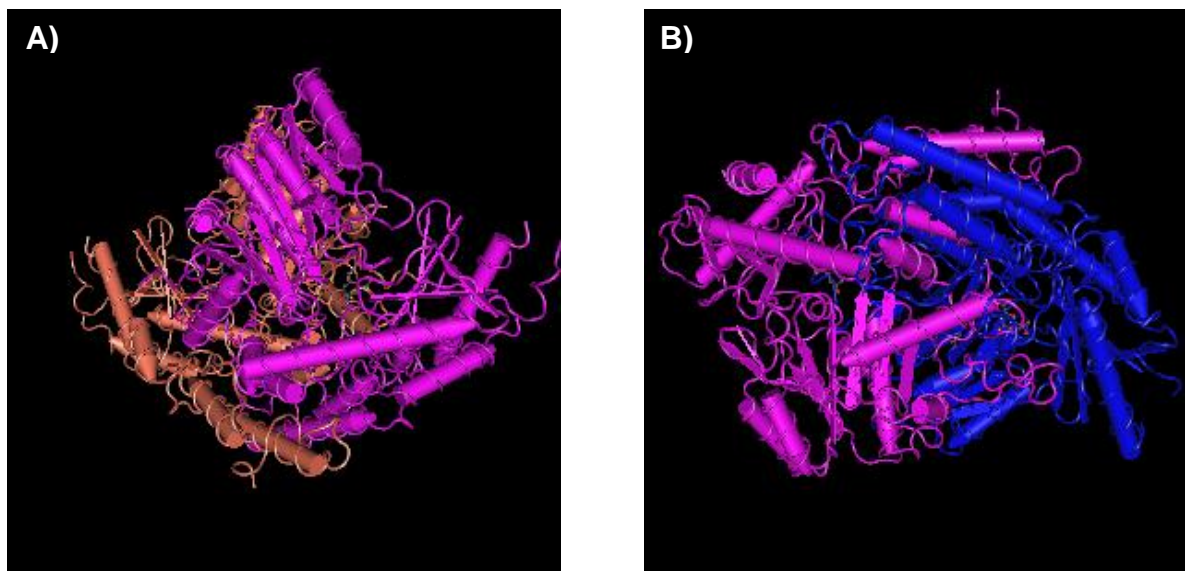


Fig. 3. Representación de la estructura tridimensional de GAD 65 y 67. A) GAD₆₅ (MMDB ID: 45224) proviene del gen localizado en el cromosoma 10p11.23, cuenta con 585 aminoácidos y pesa, como su nombre lo indica, 65 kDa. B) GAD₆₇ (MMDB ID: 106611) proviene del gen localizado en el cromosoma 2q31, cuenta con 594 aminoácidos y pesa 67 kDa. Tomado de NCBI.

Diversos estudios han demostrado que GAD₆₅ se localiza insertada en la membrana de las terminales nerviosas, y que es la encargada de sintetizar el 30 % de GABA total en el cerebro (Petroff, 2002), lo cual se explica porque la mayoría de esta enzima es sintetizada como apo-GAD y tiene una menor interacción con el fosfato de piridoxal (Kaufman y cols. 1991). Por otro lado, GAD₆₇ se localiza a nivel citosólico, específicamente, se expresa en cuerpos celulares, axones y también en terminales presinápticas. GAD₆₇ es la enzima encargada de sintetizar el 70 % restante de la concentración de GABA a nivel neuronal (Bu y cols. 1992).

Si se realiza una comparación en cuanto a su actividad, Battaglioli y cols, (2003), demostraron que la actividad de holo-GAD₆₅ solamente es del 6.7 % mientras que la actividad de holo GAD₆₇, es del 72 %, asimismo, al realizar la cinética de estas

dos enzimas, se demostró que la Km de GAD₆₅ hacia glutamato fue cuatro veces mayor en comparación con GAD₆₇ (1.41 ±0.32 mM; 0.33 ± 0.15 mM, respectivamente). De la misma manera, el paso de holo-GAD₆₅ a apo-GAD₆₅ es 15 veces más rápido que GAD₆₇, sin embargo, el mecanismo de interacción con el fosfato de piridoxal, es 10 veces más rápido con GAD₆₅ que con GAD₆₇ (Petroff, 2002).

Cuando el GABA se sintetiza, se almacena en vesículas para su posterior uso, este evento se lleva a cabo por el transportador vesicular de GABA. Una vez que la terminal presináptica es despolarizada, se estimula la fusión de vesículas en la membrana de dicha terminal y se favorece la liberación de GABA al espacio sináptico. El GABA atraviesa la hendidura sináptica hasta acercarse a la terminal postsináptica donde se localizan sus receptores blanco.

Por medio de técnicas electrofisiológicas y farmacológicas, los receptores específicos para GABA han sido identificados en todas las regiones que forman parte del SNC. Debido a que el GABA es un neurotransmisor ampliamente distribuido en el SNC, se han desarrollado fármacos que han permitido la identificación de los receptores GABA_A y GABA_B, asimismo, se ha demostrado la presencia de un tercer receptor GABAérgico denominado GABA_C, los cuales difieren en cuanto a sus propiedades farmacológicas, electrofisiológicas y bioquímicas (Olsen y Betz, 2006).

Los receptores GABA_A, se definen como canales de Cl⁻ dependientes de ligando cuyo peso molecular es de 275 kDa. Este receptor se encuentra formado por cinco subunidades, distribuidas en forma de pentámero, cuyo centro es propiamente el canal de Cl⁻. Forman parte de la superfamilia de receptores de “asa de cisteína”, en la cual se encuentran los receptores nicotínicos, los de glicina y los de serotonina (5HT₃).

Cada subunidad del receptor GABA_A, cuenta con cuatro dominios transmembranales denominados M1, M2, M3 y M4, siendo los dominios M2 los que forman parte del canal de Cl⁻ (fig. 4). Cuando dos moléculas de GABA se unen a las subunidades α y β del receptor GABA_A, se produce un cambio conformacional que permite la apertura del canal de Cl⁻, lo cual permite la entrada de este anión a la

terminal postsináptica, producir la hiperpolarización de la célula y por tanto la inhibición de su función.

Las subunidades que conforman al receptor GABA_A, tienen un peso aproximado de 50-60 kDa y se conocen como α (1-6), β (1-3), γ (1-3), δ , ϵ , θ , π y ρ (1-3), las cuales comparten 20-30 % de identidad en su secuencia entre las diferentes clases y 70 % de identidad dentro de cada clase. De esta manera, pueden existir diferentes combinaciones entre estas subunidades (cada receptor se forma solo de 5 subunidades), lo que produce diferentes perfiles farmacológicos, y ha permitido identificarlos en diferentes neuronas (Olsen y Betz, 2006).

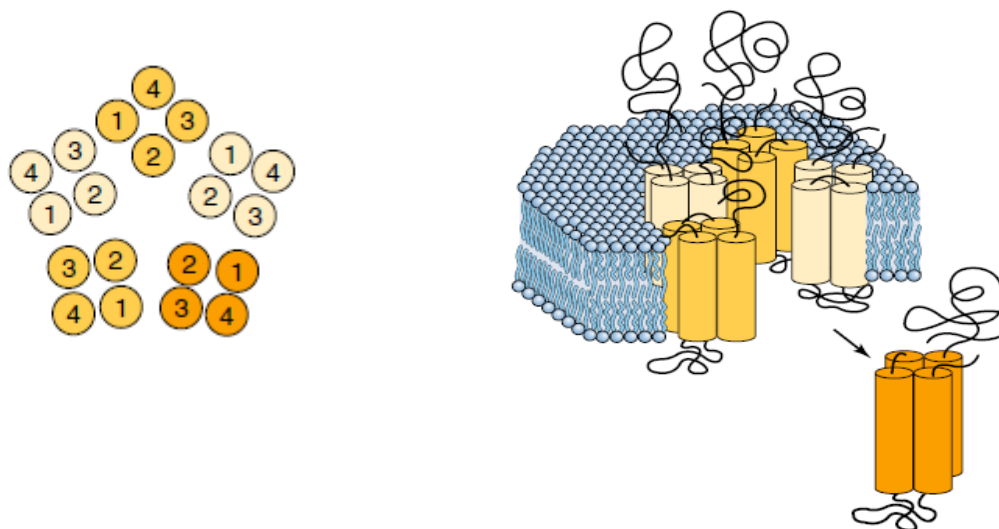


Fig. 4. Representación esquemática del receptor GABA_A. El receptor se conforma de 5 subunidades, con 4 dominios (M1-M4) cada una, siendo M2 los dominios que forman el canal de Cl⁻. La disposición de estas subunidades, permite la formación de un pentámero (tomado y modificado de Olsen y Betz, 2006).

La presencia de las diferentes subunidades en el receptor GABA_A, permite que existan diferentes sitios de interacción, lo que sugiere la gran importancia de diferentes moléculas y fármacos sobre la regulación de estos receptores. Existen dos sitios de unión a GABA, un sitio benzodiazepina, un sitio picrotoxina, un sitio de anestésicos, un sitio de esteroides y un sitio de anestésicos volátiles (Olsen y Betz, 2006).

En 1980, Bowery y cols., descubrieron un nuevo receptor, el cual denominaron GABA_B (fig. 5) que, a diferencia del GABA_A (canal de Cl⁻), se encuentra acoplado a

una proteína G inhibitoria ($G_{i/o}$) y se descubrió debido a su falta de sensibilidad a la bicuculina que es un antagonista $GABA_A$, (Olsen y Macdonald, 2002). Posteriormente, se descubrió que un análogo del GABA denominado baclofen, era capaz de activar de manera potente al receptor $GABA_B$.

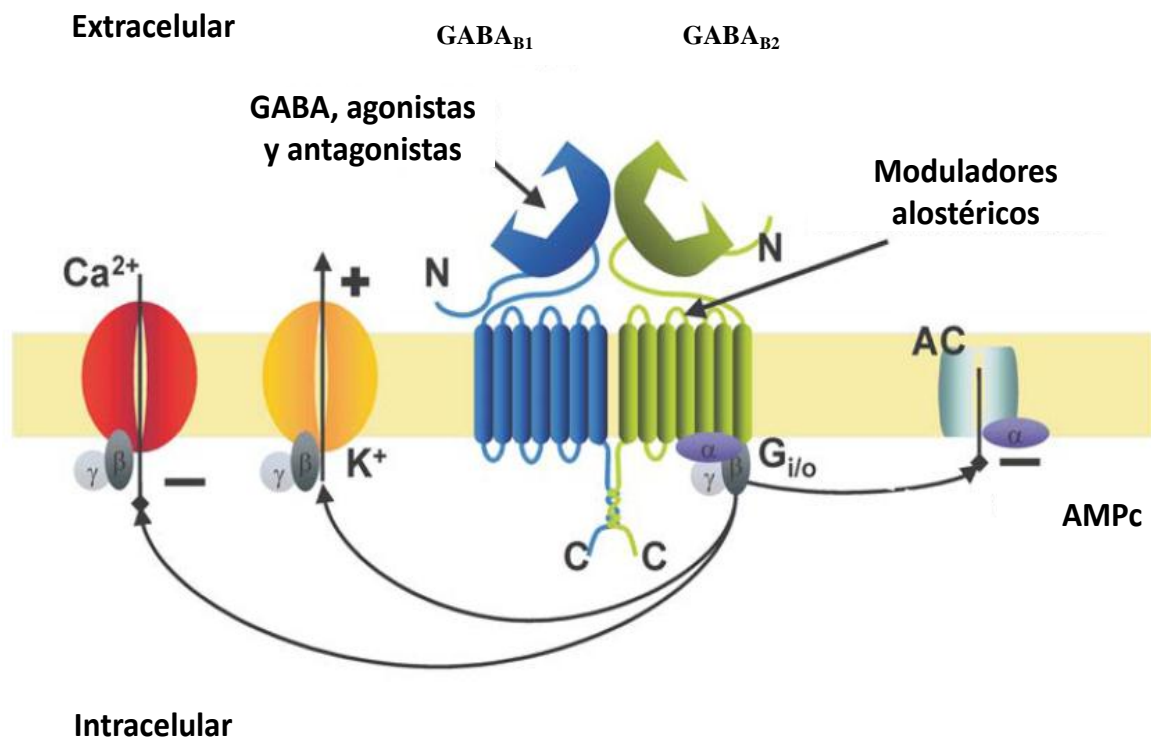


Fig. 5. Estructura del receptor $GABA_B$ y sus efectores intracelulares. El receptor $GABA_B$ se conforma de dos subunidades 7TM, denominadas $GABA_{B1}$ y $GABA_{B2}$; siendo la primera, una subunidad de 130 kDa y 961 aminoácidos, esta subunidad cuenta con el sitio de unión a ligando en su N-terminal. Por otro lado, $GABA_{B2}$ tiene un peso molecular de 110 kDa y cuenta con 940-941 aminoácidos. Esta subunidad tiene el sitio de unión a proteínas G inhibitorias. (Tomado y modificado de Matgorzata y Matgorzata, 2008).

Estos receptores metabotrópicos pueden localizarse tanto en la presinápsis como en la postsinápsis, por tanto, es un regulador importante de la neurotransmisión GABAérgica y también de otros tipos (Bowery y cols., 2002). La activación de estos receptores postsinápticos, puede inhibir canales de K^+ , mientras que, de manera presináptica, pueden disminuir la concentración de Ca^{2+} y modular la concentración de trifosfato de inositol.

La estructura de los receptores GABA_B consta de las subunidades GABA_{B1} y GABA_{B2}, y se ha demostrado ampliamente, que dichas subunidades no son funcionales cuando se encuentran por separado, sino que solamente pueden actuar cuando se encuentran unidas, esto indica que el receptor GABA_B funciona exclusivamente como un heterodímero (Matgorzata y Matgorzata, 2008).

Las dos subunidades GABA_{B1/B2}, son de siete dominios transmembranales (7TM) y cuentan con un extremo N-terminal largo y extracelular, mientras que su dominio C-terminal es corto e intracelular; son los extremos C-terminales, los encargados de entrelazar las dos subunidades y por tanto, de la funcionalidad de GABA_B (Bettler y cols., 2004). De manera particular, la subunidad GABA_{B1} tiene un peso molecular de 130 kDa y consta de 961 aminoácidos, es codificada por el gen localizado en el cromosoma 6p21.3 (Kaupmann y cols., 1998) en humanos y 20p12 en ratas (Li y cols., 2003). Es importante hacer notar, que el sitio de unión a agonistas y antagonistas, se encuentra localizado en el N-terminal de esta subunidad (Kniazeff y cols., 2002).

Por otro lado, la subunidad GABA_{B2} tiene 940-941 aminoácidos y su peso molecular es de 110 kDa; el gen localizado en el cromosoma 9q22.1-22.3 en humanos y el 5q24 en ratas, es el encargado de codificar a esta proteína. Es considerada como una subunidad huérfana, debido a que el neurotransmisor o algún otro ligando, no se une a ninguna porción, sin embargo, esta subunidad es esencial debido a que es el sitio de unión para las proteínas G y por tanto, para la activación del receptor (Galvez y cols., 2001), además, tiene la función de acarreador de GABA_{B1} desde el retículo endoplásmico hasta la superficie celular (Couve y cols., 1998).

El tercer receptor involucrado en la señalización del GABA, fue descubierto en 1984 debido a su falta de sensibilidad a bicuculina y baclofén (Alvano, 2003), y recibió el nombre de receptor GABA_C, el cual, al igual que el GABA_A, forma parte de la superfamilia de canales iónicos activados por ligando. De la misma manera, este receptor se forma de 5 subunidades las cuales a su vez se forman de 4 dominios (M1-M4), siendo M2 los dominios encargados de formar el canal (Chebib y Johnston, 2000).

Hasta ahora, se ha demostrado la presencia del receptor GABA_C en la retina (Enz y cols., 1995), tálamo, hipocampo e intestino. Participa en eventos como el procesamiento de la visión, la regulación del ciclo sueño-vigilia, dolor, aprendizaje y memoria, además participan en la secreción intestinal (Chebib, 2004). A diferencia del GABA_A que se conforma de cinco subunidades distintas, el receptor GABA_C, solo se compone de subunidades ρ (ρ_1 y ρ_2).

Diversos estudios han sugerido que cada subunidad ρ tiene un extremo N-terminal largo y un C-terminal corto, ambos extracelulares (fig. 6). También, se sugiere que entre M3 y M4, se forma una asa intracelular larga que contiene sitios determinantes para la modulación y localización del mismo receptor en las terminales sinápticas (Enz y cols., 1998).

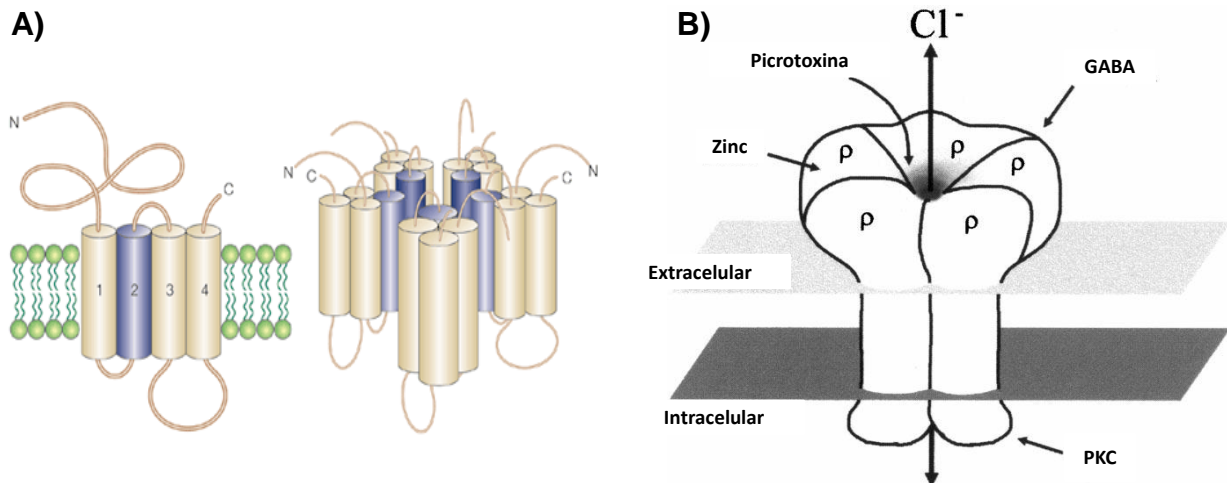


Fig. 6. Estructura del receptor GABA_C. A) El receptor se forma por 5 subunidades ρ que se ensamblan en un pentámero para formar el canal de Cl⁻. B) Los sitios de unión a tres moléculas de GABA, así como para antagonistas competitivos y neuromoduladores, se localizan extracelularmente. Asimismo, el receptor GABA_C tiene un sitio para picrotoxina en el poro y un sitio para zinc. Se sugiere que entre M3 y M4, puede existir un sitio a PKC, el cual modula la función y localización del receptor en las terminales sinápticas (tomado y modificado de Enz y cols., 1998).

Los elementos antes mencionados, conforman al sistema GABAérgico, el cual, es el principal modulador de las funciones excitadoras en el SNC (fig. 7).

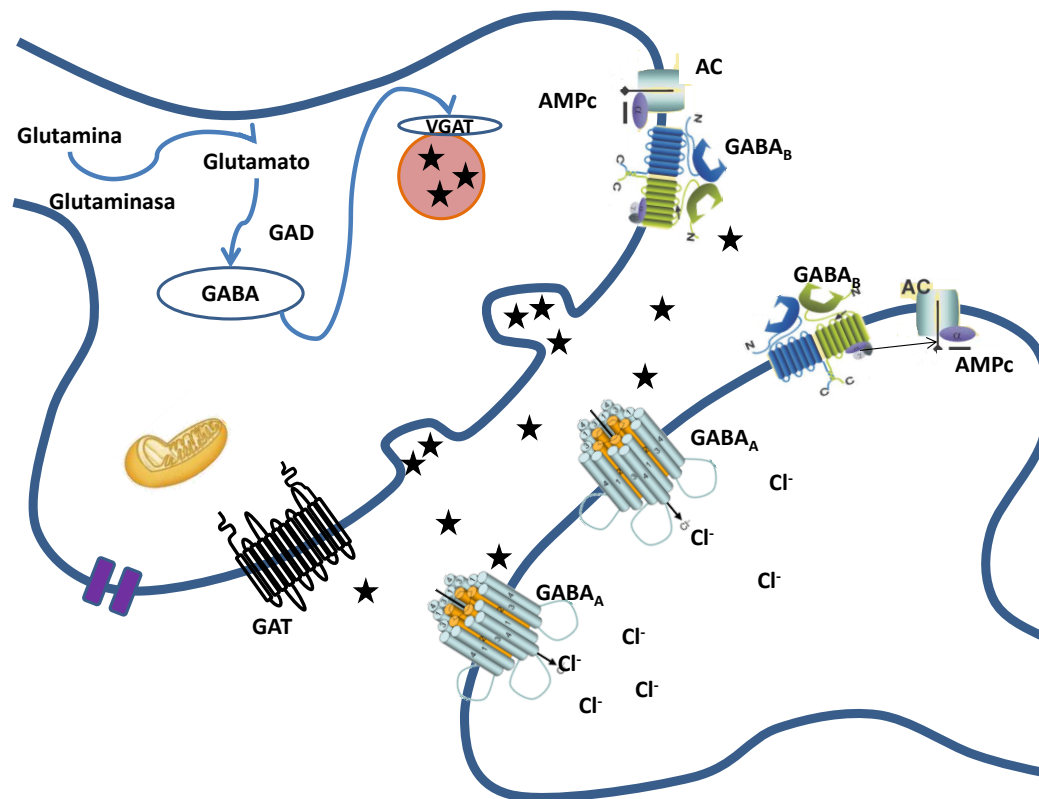


Fig. 7. Conformación del sistema GABAérgico. La glutamato descarboxilasa (GAD), sintetiza ácido γ -hidroxibutírico a partir de la descarboxilación del glutamato. Posteriormente, el GABA se almacena en vesículas a través del transportador vesicular de GABA. Cuando incrementa la concentración de Ca^{2+} en el medio intracelular, el GABA se libera al espacio sináptico en donde puede interactuar con los receptores GABA_A postsinápticos y/o GABA_B presinápticos. Finalmente, el GABA es recapturado por los transportadores de GABA, para ser degradados por la GABA-transaminasa, o bien, internalizarse nuevamente en vesículas para su posterior liberación. Tomado de Fuentes y Ruiz-Gayo, 1998.

4.1.2 La captura de GABA, es mediada por los transportadores de GABA

Una vez que el GABA ha interactuado con sus respectivos receptores, se internaliza nuevamente a las terminales presinápticas o a los astrocitos. Este proceso lo llevan a cabo proteínas denominadas “transportadores de GABA” (GATs), cuyas funciones son la terminación de la transmisión sináptica, delimitar el sitio de acción del GABA al prevenir que este neurotransmisor actúe sobre neuronas

vecinas, permitir la reutilización rápida de GABA y ahorrar energía celular y por último, en ciertas ocasiones, actuar como un transportador inverso e incrementar la liberación de GABA (Borden, 1996).

Se ha demostrado que existen cuatro transportadores de GABA denominados GAT-1, GAT-2, GAT-3 y BGT-1 (transportador de GABA y betaína) (Borden, 1996), los cuales son proteínas que pertenecen a la familia de transportadores dependientes de Na^+ y Cl^- (Kanner, 1994) o SLC6 (por solute carrier 6) al igual que los transportadores de dopamina, serotonina, noradrenalina y glicina.

El mecanismo por el cual los GATs “capturan” el GABA del espacio sináptico comienza cuando el GABA se une al transportador en estado de reposo, lo que permite el paso al estado activo, en el cual dos moléculas de Na^+ y una de Cl^- se unen al GAT que sufrirá un cambio de conformación e internalizará al GABA, Na^+ y Cl^- . Cuando el transportador se encuentre vacío, este regresará a su conformación de reposo para repetir el ciclo (Kanner, 1994).

En general, los GATs y todos los transportadores pertenecientes a la familia SLC6, son proteínas de doce dominios transmembranales cuyos extremos N y C terminales son intracelulares, los cuales, se encargan de modular varios procesos como el tráfico de proteínas, la estequiometría en cuanto a los iones transportados y la función del mismo transportador (Kristensen y cols., 2011). Además, estos transportadores se caracterizan por tener una asa extracelular muy larga entre los dominios 3 y 4 transmembranales, cuentan con sitios intracelulares consenso de fosforilación y sufren modificaciones post-traduccionales como glicosilación y palmitoilación (Foster y Vaughan, 2011) (fig. 8).

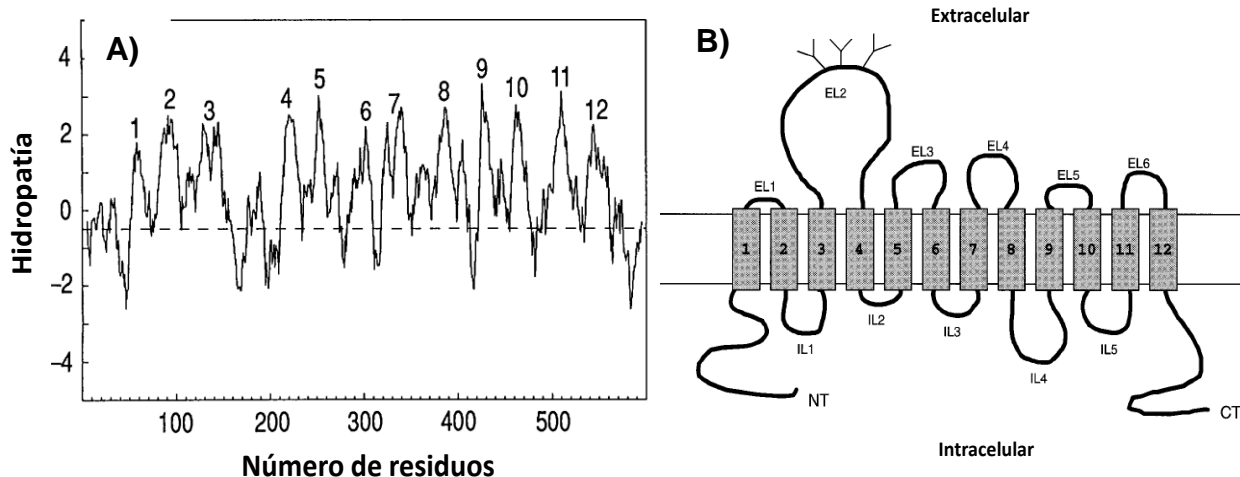


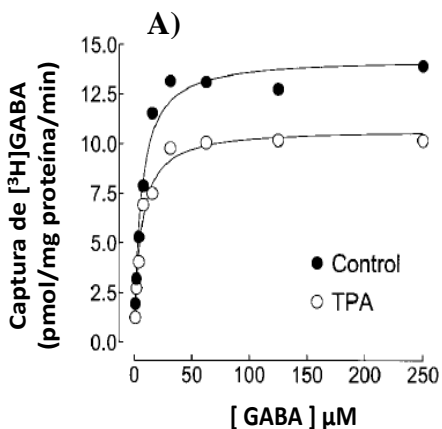
Fig. 8. Modelo teórico de GAT-1. A) Análisis hidropático del GAT1. B) Topología del GAT-1 basado en el análisis hidropático. El transportador tiene una asa extracelular muy larga entre los dominios transmembranales 3 y 4, donde se encuentran tres sitios de N-glicosilación. Los extremos N y C terminales son intracelulares y participan en la modulación de otras proteínas para el tráfico o la función (tomado y modificado de Guastella y cols., 1990 y Bennet y Kanner, 1997).

El GAT-1, fue el primer transportador de la familia SLC6 en ser purificado y clonado (Guastella y cols., 1990). Es el principal transportador de GABA cuyo ARNm se ha localizado en la retina, en todo el sistema límbico, en los núcleos del cerebro basal medio, en las capas IV-V de la corteza, en la corteza del cerebelo, en el tálamo, el hipotálamo, el estriado, el GPe, la SNr, el hipocampo, el tallo cerebral, la médula espinal y el bulbo olfatorio (Swan y cols., 1994; Ikegaki y cols., 1994; Minelli y cols., 1995; Durkin y cols., 1995), por tanto, se sugiere que dicho transportador juega un papel importante en la regulación de la neurotransmisión GABAérgica. El marco de lectura abierto de GAT-1 comprende 1797 nucleótidos, los cuales codifican para una proteína de 599 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 67 kDa sin tomar en cuenta las glicosilaciones presentes entre M3-M4 (Borden, 1996).

Diversos estudios se han realizado con la finalidad de saber la correcta regulación de este transportador. Estos estudios se basan en la estructura y sitios consenso no solo de los GATs, sino de todos los integrantes de la familia SLC6. El análisis de la secuencia aminoacídica de estos transportadores, ha sugerido que los dominios intracelulares contienen sitios importantes donde se llevan a cabo interacciones con diversas proteínas, lo cual sugiere que la actividad de GAT-1,

puede depender de proteínas cinasas (Guastella y cols., 1990; Corey y cols., 1994; Bahena-Trujillo y Arias-Montaña, 1999; Quick y cols., 2004; González y cols., 2006) fosfatasas, y otras proteínas que puedan participar en la modulación y distribución de estos transportadores en la sinapsis o en los astrocitos (Quick, 2002; Quick, 2006; Fan y cols., 2006).

Se ha sugerido que el GAT-1 en su estructura, tiene tres sitios de fosforilación para PKC, localizados en Ser²⁴, Thr⁴⁶ y Ser⁵⁶², mientras que existe un sitio extracelular de fosforilación para PKA (Guastella y cols., 1990), debido a esto, los estudios en cuanto a la modulación de GAT-1, se han enfocado en su regulación a partir de estas dos cinasas. Corey y cols., en 1994 mostraron que el uso de forbol 12 miristato 13- acetato (PMA), un activador de la PKC, incrementa la captura de GABA en ovocitos de *Xenopus* que expresan al GAT-1. Sin embargo, Bahena-Trujillo y Arias-Montaña en 1999, mostraron que la activación de la PKC con forbol 12-tetradecanoil-13-acetato (TPA) en sinaptosomas de SNr de rata, disminuye la captura de GABA, asimismo, el bloqueo de la PKC con estaurosporina, previno el efecto del TPA (fig. 9 A y B). De la misma manera, en células de ovario de hámster chino (CHO) que expresan establemente al GAT-1, se demostró que la activación de la PKC produce internalización del GAT-1; este incremento en la internalización del transportador, podría ser la explicación de la disminución en la captura de GABA (Quick y cols., 2004).



B)

	Captura de [³ H]GABA (% del control)
Control	100 ± 1
TPA (100 nM)	81 ± 2
Estaurosporina (100 nM)	97 ± 3
TPA+estaurosporina	103 ± 3

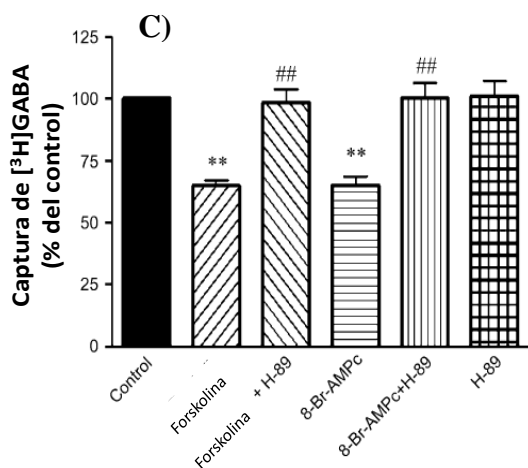


Fig. 9. Efecto de la activación de las proteínas cinasas C y A sobre la captura de GABA. A y B) La activación de PKC disminuye la captura de GABA en sinaptosomas de SNr, mientras que la inhibición de esta proteína, no produce cambios con respecto al control; C) la activación de Ac-PKA disminuye la captura de GABA en el GPe (** diferencia con respecto al control; ## diferencia con respecto a forskolina o 8-Br-AMPC). Tomado y modificado de Bahena-Trujillo y Arias-Montaño, 1999 (A y B) y González y cols., 2006 (C).

Por otro lado, existen estudios donde se propone que la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA), tiene un papel importante en la modulación del GAT-1 sobre la captura de GABA (González y cols., 2006). Un estudio realizado en cultivos neuronales, demostró que el ARNm para GAT-1, disminuye al activar a la enzima adenilil ciclasa (Ac) con forskolina (Gomez y cols., 1994). Este evento podría ser la explicación de los resultados encontrados por el grupo de Floran (González y cols., 2006), ya que mostraron, que la activación de Ac con forskolina y de la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) con 8-bromo-AMPC, disminuye la captura de GABA en el GPe de ratas intactas de manera importante (fig. 9C).

Sin embargo, no solamente las proteínas cinasas pueden actuar sobre la regulación de GAT-1. Diversos estudios han mostrado que los factores de crecimiento como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) pueden inducir

la presencia de GAT-1 en la membrana celular, esto como resultado de la fosforilación de tirosinas en el GAT-1 (Law y cols., 2000). Asimismo, se ha sugerido que la maquinaria encargada de la liberación de neurotransmisores a partir de vesículas, conformada por SNAP25/sintaxina 1A, participa en la disminución de la función de GAT-1 (Fan y cols., 2006). Estos diferentes eventos, indican la importancia de GAT-1 en el SNC y pone de manifiesto la compleja regulación que dicha proteína tiene.

Posterior al descubrimiento del GAT-1 y con la disponibilidad de la secuencia de nucleótidos de esta proteína, fue posible descubrir otros dos transportadores, que, al seguir la nomenclatura propuesta por Guastella y cols., (1990), fueron denominados GAT-2 y GAT-3 (Borden y cols., 1992). Por un lado, GAT-2 comprende un marco de lectura abierto de 1806 pares de bases, las cuales codifican para una proteína de 602 aminoácidos. Por otro lado, GAT-3 comprende un marco de lectura abierto de 1881 pares de bases y codifica para una proteína de 627 aminoácidos. Al igual que GAT-1, son proteínas de 12 dominios transmembranales con múltiples sitios de glicosilación en el asa extracelular formada entre M3 y M4. Ambos transportadores tienen aproximadamente un 52 % de identidad con el GAT-1 y un 67 % entre ellos (Borden y cols., 1992) (fig.10).

En cuanto a la localización de cada transportador, GAT-2 se encuentra tanto en SNC (cerebro y retina) como en sistema nervioso periférico (SNP, hígado). En cambio, GAT-3, se localiza exclusivamente en el SNC. El ARN mensajero de esta proteína ha sido localizado en el tálamo, el hipotálamo, la amígdala, el tallo cerebral, la corteza, el estriado, el hipocampo y la corteza cerebelar (Ikegaki y cols., 1994). De manera importante, la localización de este transportador es exclusivamente en astrocitos (Minelli y cols., 1996) y se propone que su función es regular las concentraciones extracelulares de GABA en la denominada “sinapsis tripartita”.

Un parámetro importante en cuanto a la actividad de los tres transportadores, es su dependencia a los iones que cotransportan (Borden y cols., 1992). Se ha demostrado la completa dependencia al Na^+ por parte de los tres GATs, ya que cuando se ha reemplazado este ión por Li^+ , la captura de GABA disminuye significativamente. Sin embargo, cuando el Cl^- es sustituido por acetato, se observan

diferentes eventos, el GAT-1, solo disminuye su actividad en un 5 %, GAT-2 disminuye la función de captura en un 43 % y GAT-3 se inhibe en un 20 % (Borden y cols., 1992).

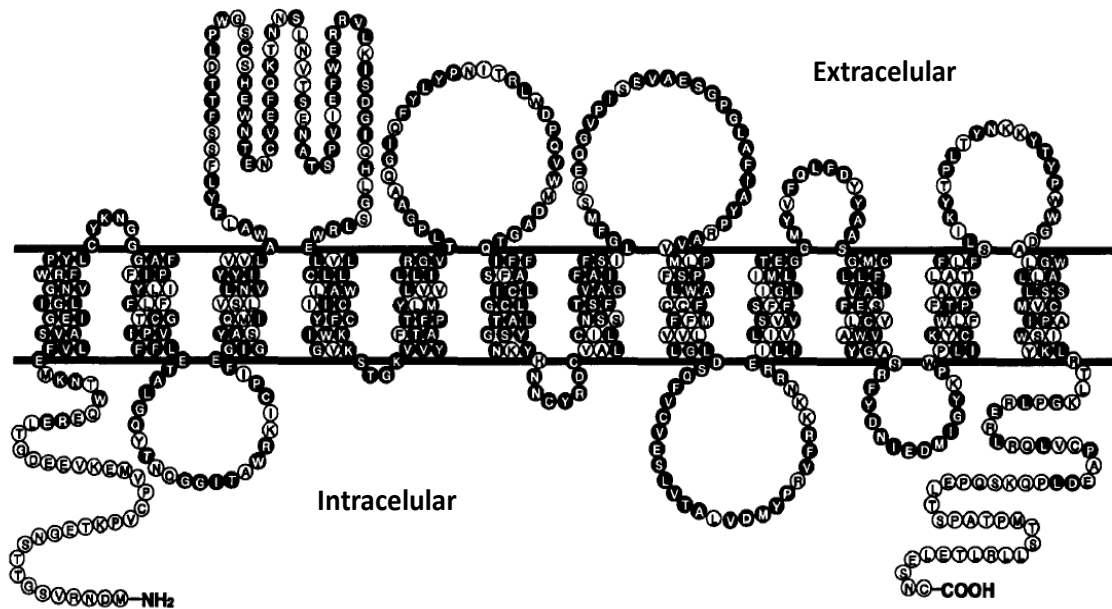


Fig. 10. Modelo topológico de GAT-2. Secuencia aminoacídica de GAT-2, deducida a partir del marco de lectura abierto de este transportador. Los residuos en negro, son los aminoácidos que también se localizan en GAT-3 (tomado y modificado de Borden y cols., 1992).

El último de los transportadores que ha sido identificado, es el BGT-1 y este fue descubierto a partir de estudios de fisiología renal donde se demostró la presencia de un transportador de betaína dependiente de Na^+ y Cl^- (Rasola y cols., 1995). Más adelante, se estudió el transporte de betaína en ovocitos de *Xenopus* que expresaban a dicho transportador (Yamauchi y cols., 1992); fue en estos estudios donde se demostró, que podía ocupar GABA y betaína como sustratos, debido a ello, se le asignó el nombre de BGT-1. Aunque este transportador no es tan sensible a inhibidores de los GATs (L-DABA o β -alanina $\text{IC}_{50} \geq 2 \text{ mM}$), sí es muy sensible al GABA ($K_M = 93 \mu\text{M}$).

El BGT-1 es una proteína de 614 aminoácidos con 12 dominios transmembranales y, a diferencia de los GATs, solo comprende 2 sitios de glicosilación en el asa comprendida entre M3 y M4 y comparte un 70 % de identidad con el GAT-2 y un 66 % de identidad con el GAT-3 de rata (Borden y cols., 1996). La

función de esta proteína, como su nombre lo indica, es transportar GABA, pero, a diferencia de los GATs, modula a este neurotransmisor a nivel renal.

4.2 El circuito de los ganglios basales

Desde el punto de vista anatómico, los ganglios basales (GB) se definen como un “conjunto de masa gris” que se ubican por debajo del telencéfalo, y que están embebidos en la materia blanca de cada hemisferio del cerebro (Herrero y cols., 2002). Son núcleos que, si bien funcionan como un circuito, necesitan de la corteza y el tálamo para regular de manera correcta las funciones asociativas, límbicas y motoras que tienen a su cargo (Obeso y Lanciego, 2011).

Los GB incluyen el estriado (caudado, putamen y núcleo *accumbens*), el globo pálido en su porción externa (GPe) e interna (GPi), el núcleo subtalámico (NST), la sustancia *nigra* en su porción compacta (SNc) y reticulada (SNr) y el área ventral tegmental (Helie y cols., 2013). El estriado es el núcleo considerado como de “entrada” de la información, mientras que SNr/GPi son los núcleos de “salida” de la información del circuito de los GB.

Diversas evidencias han mostrado que el estriado se divide en una porción ventral y otra dorsal. En cuanto al estriado ventral, este comprende el núcleo *accumbens*, las porciones ventromedial del caudado y putamen y también el bulbo olfatorio. Por otro lado, el estriado dorsal comprende el resto del caudado y putamen; es esta porción, la encargada de las funciones motoras (Helie y cols., 2013).

El estriado es el principal núcleo de entrada de los GB y se encuentra formado principalmente por neuronas espinosas medianas (NEM), cuya actividad es determinada o regulada por las neuronas provenientes de la corteza y del tálamo (Reiner, 2010).

Las neuronas provenientes de la capa III y V del área cortical, reciben el nombre de neuronas cortico-estriatales, debido a que su función se realiza en el estriado (Alexander y cols., 1986). Estas neuronas, son la principal proyección glutamatérgica al estriado, y se encarga de proveer a este último, la información necesaria para permitir las diversas funciones motoras (Gerfen, 1992).

Todas las neuronas corticoestriatales son de tipo piramidal y su naturaleza es glutamatérgica. Se ha demostrado que, aproximadamente, de 5000 a 10000 neuronas glutamatérgicas, hacen sinápsis con una NEM (Helie y cols., 2013), y estas pueden ser de dos tipos, conocidas como neuronas del tracto piramidal (PT) y neuronas intertelencefálicas (IT). Las PT, son de la corteza frontal y son las que en su mayoría proyectan a las motoneuronas del tallo cerebral y médula espinal, además de que envían colaterales al estriado. Estas colaterales regulan directamente el movimiento. Por otro lado, las IT se localizan en regiones corticales agranulares que proyectan al estriado de manera más arborizada que las PT (fig. 11) y se encuentran en casi todo el estriado, según lo que se ha demostrado con técnicas de marcaje anterógrado, donde además de mostrar su arquitectura, se ha demostrado que su localización es específica, pues las PT se dirigen a la vía indirecta, mientras que las IT se dirigen a la vía directa de los GB (Lei y cols., 2004), lo cual, puede ser un hallazgo importante para el entendimiento del circuito de los GB.

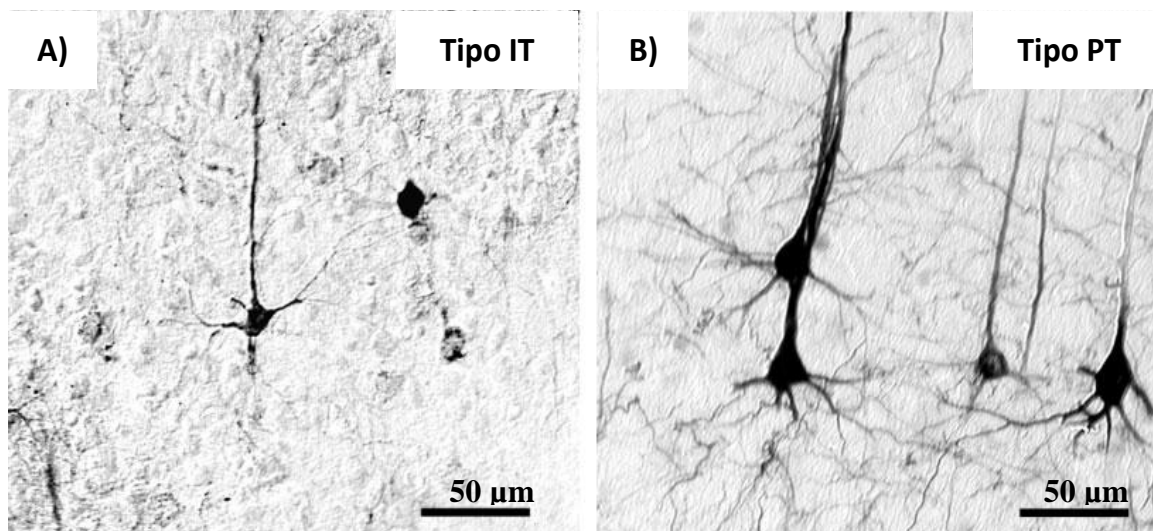


Fig. 11. Neuronas glutamatérgicas cortico-estriatales de tipo intratelencefálica (IT) y del tracto piramidal (PT). Se muestra el soma de las neuronas IT (A) y de las neuronas PT (B) en la corteza. Las neuronas del tipo IT fueron marcadas retrógradamente desde el estriado con RDA3k. Son neuronas de 12-13 µm y se localizan en la capa III de la corteza principalmente. Por otro lado, las neuronas del tipo PT, se marcaron con el trazador retrógrado BDA3k (molécula aniónica de fijación a lisina) desde el tracto piramidal pontino, se localizan principalmente en la capa V de la corteza y son neuronas largas de aproximadamente 18-19 µm (tomado y modificado de Reiner y cols., 2003).

4.2.1 Conformación del estriado

Como se ha mencionado anteriormente, el estriado se conforma del caudado, el putamen y el núcleo *accumbens* y es considerado el núcleo de entrada de la información a los GB (Alexander y cols., 1986; Obeso y Lanciego, 2011).

El estriado se forma principalmente de NEM, las cuales, son neuronas de proyección que se encuentran homogéneamente distribuidas a lo largo de todo el estriado y representan aproximadamente el 95 % de la población de neuronas estriatales (Grofova, 1975). El 5 % restante, corresponde a interneuronas, que al igual que las NEM, se encuentran distribuidas en el estriado, y, aunque no son de proyección, estas neuronas pueden hacer sinapsis con las NEM y así, modular su función. La naturaleza de estas interneuronas es colinérgica, GABAérgica y peptidérgica (Kawaguchi y Kubota, 1993).

Las NEM, tienen un soma de 12-20 μm de diámetro, el cual tiene de 7 a 10 dendritas altamente ramificadas y con una gran cantidad de espinas (fig. 12). Dichas neuronas, proyectan su axón desde el estriado hasta el GPe y SNr/GPi (Kawaguchi y cols., 1990), lo cual permite la formación de las denominadas vías directa e indirecta, siendo la vía directa, la conformada por NEM que proyectan directamente a los núcleos de salida (SNr/GPi), mientras que en la vía indirecta, las NEM proyectan al GPe y al NST, para regular la función de los núcleos de salida (Obeso y Lanciego, 2011). A pesar de que todas las NEM expresan GAD, existen marcadores específicos que permiten diferenciar entre las que forman parte de la vía directa de aquellas que forman parte de la vía indirecta, ya que las NEM de la vía indirecta contienen el neuropéptido encefalina, mientras que las NEM de la vía directa contienen sustancia P y dinorfina (Gerfen y Young, 1988).

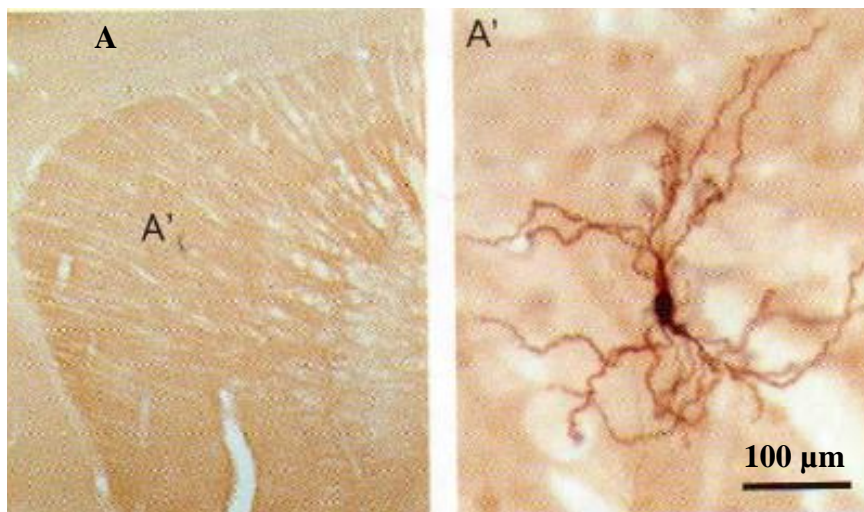


Fig. 12. Neuronas espinosas medianas estriatales. A) Fotomicrografía de una neurona espinosa mediana teñida con biotina; A') magnificación de la misma NEM (tomada de Gerfen y Bolam, 2010).

Por otro lado, las interneuronas que forman el 5 % del estriado, son de una gran variedad morfológica y neuroquímica que se dividen en dos grupos. Uno de ellos, está formado por neuronas largas no espinosas de naturaleza colinérgica (Kawaguchi y Kubota 1993) y el otro grupo, son interneuronas medianas no espinosas de tipo GABAérgico (Kita, 1993) (fig. 13).

En cuanto a las características de las interneuronas del estriado, las interneuronas colinérgicas son fácilmente identificables en el estriado debido a que tienen un cuerpo celular de 40 μm de diámetro, del cual sobresalen largas dendritas sin espinas y su axón es extremadamente fino. Como se espera, son neuronas positivas a la colina acetil transferasa (ChAT), la cual, es la enzima de síntesis de la acetilcolina (ACh) (fig. 13) (Kawaguchi y Kubota 1993). Por otro lado, las neuronas no espinosas GABAérgicas, son el segundo mayor subgrupo de interneuronas del estriado, y son fácilmente diferenciables de las NEM, debido a que estas expresan mayoritariamente GAD67 (fig. 13), mientras que las NEM expresan GAD65. Además, las interneuronas expresan somatostatina y neuropéptido Y, así como parvalbúmina y calretinina (Gerfen y Bolam, 2010).

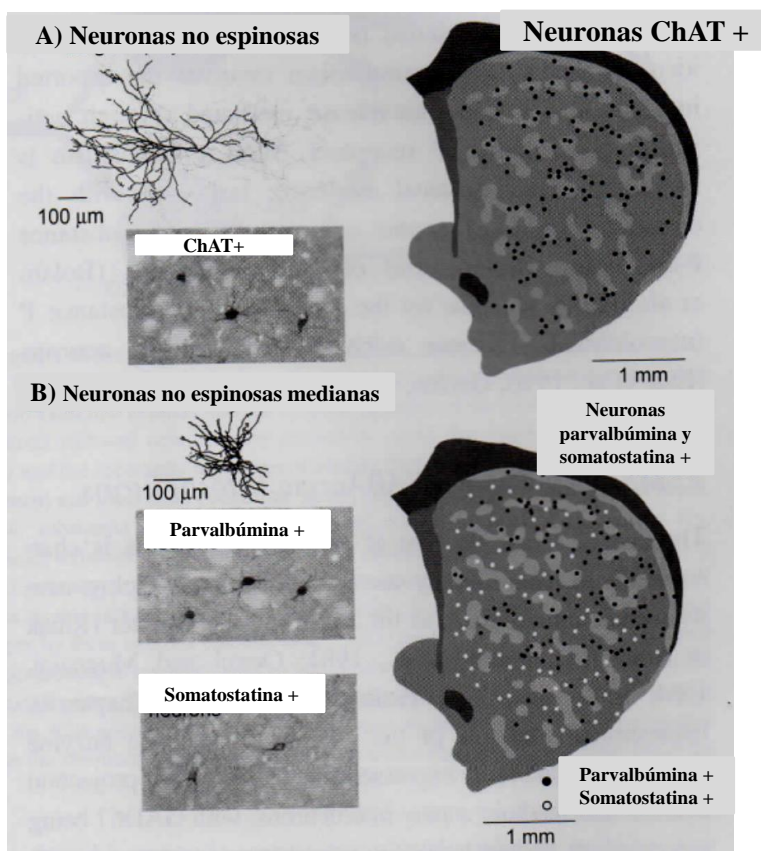


Fig. 13. Interneuronas estriatales. A) Interneuronas colinérgicas no espinosas; B) interneuronas no espinosas medianas GABAérgicas (tomado de Gerfen y Bolam., 2010).

4.2.2 Estructura del globo pálido externo y del núcleo subtalámico

En el GPe, al igual que en el estriado, existen dos tipos neuronales, uno cuyo cuerpo celular es largo y radia de tres a cinco dendritas de 300 a 400 µm sin espinas, que se ramifican de dos a tres veces y tienen forma de disco. El otro tipo neuronal se distingue por el gran número de espinas distribuidas en sus dendritas; el cuerpo neuronal es más pequeño que las no espinosas y su longitud es similar (1 mm). Estas dos poblaciones de neuronas, GAD positivas y lo que difiere en ellas es la morfología y ciertos marcadores neuroquímicos como la parvalbúmina, ya que las neuronas discoidales no espinosas, presentan parvalbúmina y son las más abundantes en el GPe (Kita y Kitai, 1994).

Ambas poblaciones neuronales, proyectan hacia diferentes sitios de los GB, pues, las neuronas positivas a parvalbúmina, proyectan colaterales hacia el NST,

GPI, y SNr (Baufreton y cols., 2009), mientras que las neuronas parvalbúmina negativas, proyectan casi exclusivamente al NST. Asimismo, existe una pequeña población de neuronas colinérgicas en el centro del GPe (Grove y cols., 1986) cuya función parece ser regular la liberación de glutamato cortical (Ingham y cols., 1988).

El GPe, recibe las proyecciones de las NEM provenientes del estriado (Parent y Hazrati, 1995; Obeso y Lanciego, 2011), además de neuronas glutamatérgicas del NST; las neuronas GABAérgicas del GPe, proyectan hacia otros núcleos de los GB, siendo los principales aceptores, el NST, SNr/GPi y el estriado (Kita y Kitai, 1994).

A pesar que el principal neurotransmisor del GPe es el GABA, existen evidencias que indican que la dopamina (DA) juega un papel importante en la modulación de dicho núcleo. Floran y cols., (1997), mostraron que la administración de DA en el GPe de ratas, disminuye la liberación de GABA; asimismo, se ha demostrado la presencia de tirosina hidroxilasa (TH), la cual es la enzima limitante en la síntesis de DA (Fuchs y Hauber, 2004).

Como se ha mencionado anteriormente, el GPe proyecta neuronas GABAérgicas al NST, el cual, se encuentra formado principalmente por neuronas de tipo glutamatérgico. El cuerpo de estas neuronas es ovoide o poligonal, y mide aproximadamente de 10 a 20 μm de diámetro, generalmente, estas neuronas tienen de 3 a 4 dendritas sin espinas, las cuales se estrechan y ramifican en dendritas secundarias y terciarias.

Además de las proyecciones que recibe del GPe, el NST también recibe proyecciones de la corteza, las cuales son de naturaleza glutamatérgica. Asimismo, las neuronas subtalámicas, envían axones al GPe y a SNr/GPi así como al estriado con la finalidad de proveer una regulación excitatoria en cada uno de estos núcleos (Kita y Kitai, 1987).

4.2.3 Estructura de la sustancia nigra reticulada y del globo pálido interno

La SNr y el GPI, son considerados los núcleos de salida en el circuito de los GB (Parent y Hazrati, 1995) y son los encargados de “comunicar” la información de

los GB, con los núcleos que se encuentran fuera del circuito, en específico con el tálamo y con estructuras del cerebro medio (Deniau y Chevalier, 1992).

Ambos núcleos, utilizan GABA como neurotransmisor, asimismo, son de naturaleza GABAérgica las principales proyecciones provenientes del estriado (Deniau y Chevalier, 1985) y del GPe, mientras que las neuronas que provienen del NST son de naturaleza glutamatérgica (Kita y Kitai, 1987).

Las proyecciones de la SNr/GPi, terminan en la porción ventromedial del tálamo, el cual, proyecta a las áreas corticales determinadas (Gerfen y Bolam, 2010).

4.2.4 Funcionamiento de los ganglios basales

Fisiológicamente, los GB se definen como el conjunto de núcleos que controlan del movimiento voluntario (Cui y cols., 2013); junto a la corteza y tálamo ventromedial, los GB cierran un circuito motor cuyo funcionamiento aún no es del todo comprendido, sin embargo, el estudio de la vía directa e indirecta a partir del estriado, permite un estudio detallado del funcionamiento motor de este circuito (Penney y Young, 1986; Alexander y cols., 1986; Obeso y Lanciego, 2011; Freeze y cols., 2013; Cui y cols., 2013). La principal función de ambas vías es modular la actividad de los núcleos de salida (SNr/GPi), ya que la activación o inhibición de dichos núcleos, activa o inhibe el movimiento (Gerfen y Surmeier, 2011).

La vía directa (fig. 14) se caracteriza por tener una proyección monosináptica formada por NEMs que expresan receptores dopaminérgicos del tipo D1, sustancia P y dinorfina. Su función es liberar GABA con la finalidad de inhibir a los núcleos de salida (SNr/GPi). Este evento inhibitorio, activa al tálamo ventral, el cual transmite la información (glutamatérgica) hacia la corteza, lo cual produce movimiento.

Por otro lado, la vía indirecta de los GB (fig. 14), a pesar de estar formada igualmente por NEMs, estas expresan receptores dopaminérgicos tipo D2 y encefalina, además de que su proyección es de tipo polisináptica, pues el estriado envía información hacia el GPe y posteriormente al NST (Herrero y cols., 2002) para finalmente activar a SNr/GPi, que producirá, al contrario de la vía directa, la inhibición

del tálamo ventral, lo cual inhibe el movimiento (Parent y Hazrati, 1995; Freeze y cols., 2013).

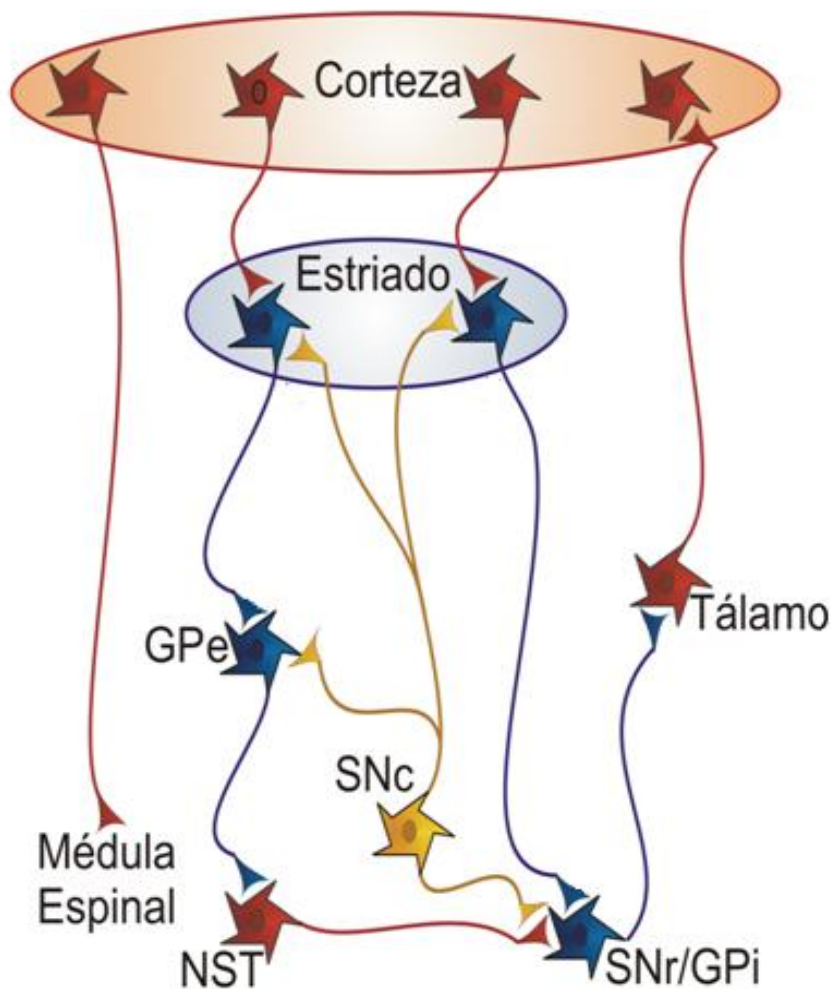


Fig.14. Circuito de los ganglios basales. La vía directa del estriado hacia SNr/GPi, activa el movimiento, mientras que la vía indirecta del estriado-GPe-NST-SNr/GPi lo inhibe. Rojo: neuronas glutamatergicas; azul: neuronas GABAérgicas; amarillo: neuronas dopaminérgicas. Laboratorio del Dr. Benjamín Florán.

4.2.5 Papel de la dopamina sobre el funcionamiento de los ganglios basales

Las neuronas dopaminérgicas, se localizan principalmente en los núcleos del cerebro medio, los cuales incluyen el área ventral tegmental (VTA), la SNc, la SNr y

el área retrorubral (Gerfen y Bolam, 2010). Dichas neuronas dopaminérgicas, se dividen en diferentes grupos de acuerdo a su localización (Deumens y cols., 2002):

- Grupo A10: Neuronas dopaminérgicas del VTA. Son neuronas que proyectan a áreas límbicas principalmente como el área septal, corteza prefrontal, bulbo olfatorio y núcleo accumbens.
- Grupo A9: Neuronas dopaminérgicas de la SN. Son neuronas que proyectan al estriado.
- Grupo A8: Neuronas dopaminérgicas del área retrorubral. Al igual que A9, proyectan al estriado.

La inervación dopaminérgica hacia el estriado es densa y uniforme; las neuronas del grupo A9 y A8, se encuentran en la porción ventral y lateral de la SNc y proyectan hacia el estriado dorsal y lateral; son estas neuronas dopaminérgicas, las encargadas del control motor estriatal (Deumens y cols., 2002).

Asimismo, la SNc envía proyecciones dopaminérgicas hacia el GPe, SNr, tálamo y corteza, con la finalidad de regular la actividad de dichos núcleos.

El control de la dopamina sobre la neurotransmisión GABAérgica y glutamatérgica de los GB, lo realiza a través de los receptores dopaminérgicos, los cuales son receptores 7TM. Se ha demostrado que existen cinco tipos de receptores dopaminérgicos (D1-D5) acoplados a proteínas G (PG), los cuales se agrupan en dos clases importantes (D1 like y D2 like) basadas en el tipo de PG a la que se acoplan dichos receptores: la familia D1 like se conforma por los receptores D1 y D5, los cuales se acoplan a PG estimuladoras (G_s y G_{olf}), mientras que los receptores de la familia D2 like, formada por los receptores D2, D3 y D4, se acoplan a PG inhibitorias ($G_{i/o}$) (Neve y cols., 2004).

Por un lado, la activación de $PG_{s/olf}$, estimula a la Ac, lo cual incrementa la concentración intracelular del segundo mensajero AMPc y la actividad de la PKA. Dicha proteína, permite la activación de una amplia gama de proteínas, entre las que se encuentran factores de transcripción, canales dependientes de voltaje y receptores de glutamato (Svenningson y cols., 2004). Por otro lado, la activación de

PG_{i/o}, tiene un efecto contrario, es decir, inhibe a la Ac, disminuye la concentración de AMPc e inhibe a PKA, por tanto, inhibe canales dependientes de voltaje, así como algunas isoformas de la PLC (Hernandez-Lopez y cols., 2000). Además, los receptores de la familia D2 like, también tienen la característica de modular a los reguladores de la señalización de PG (RGS), las cuales, se encuentran densamente expresadas en el estriado.

Los cinco receptores dopaminérgicos, has sido localizados en todo el circuito de los GB, principalmente en el estriado (fig. 15), sin embargo, los receptores D1 y D2, se encuentran en mayor proporción y de manera diferenciada; es decir, los receptores D1, se localizan principalmente en NEM de la vía directa, mientras que los receptores D2 están en las NEM de la vía indirecta (Surmeier y cols., 1996). Estos eventos se demostraron a partir de medir el ARN mensajero de dichos receptores y de la sustancia P, así como el de encefalina; los resultados mostraron que el ARN mensajero para el receptor D1 y el de sustancia P colocalizaban en las NEM de la vía directa, mientras que el ARN mensajero para el receptor D2, colocalizaba con el de encefalina en las NEMs de la vía indirecta (Gerfen y cols., 1990).

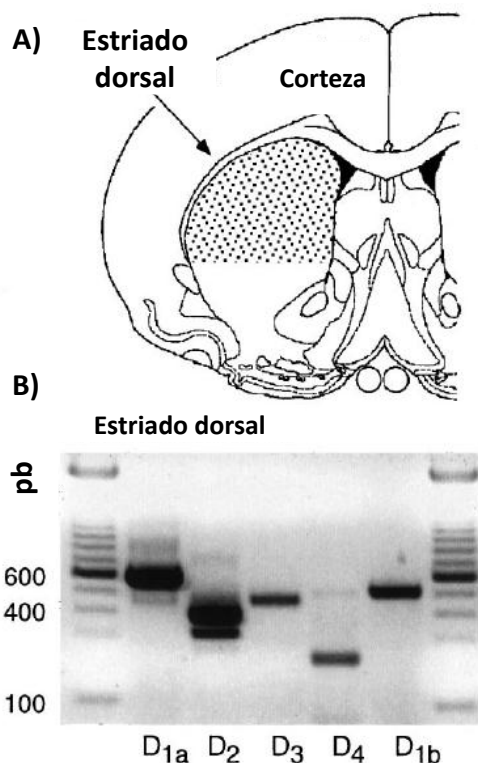


Fig. 15. ARN mensajero de los cinco receptores dopaminérgicos en el estriado. A) Representación de la región dorsal del estriado que fue analizada. B) fotografía de un gel teñido con bromuro de etidio, en el cual los amplicones para cada receptor fueron separados por electroforesis. Tomado y modificado de Surmeier y cols., 1996.

La localización de los receptores D1 y D2 en la vía directa e indirecta respectivamente, es determinante en la correcta regulación de los GB en cuanto a la inhibición y activación de la actividad motora. En 1990, Floran y cols., mostraron que la activación de los receptores D1 en rebanadas de SNr, incrementa la liberación de [³H]GABA, mientras que la activación de los receptores D2 en el GPe, disminuye la liberación de este mismo neurotransmisor marcado radiactivamente (Floran y cols., 1997) (fig. 16 A-C). De la misma forma, los receptores D3 y D4, tienen un papel importante en la regulación de la liberación de GABA en la vía directa e indirecta, ya que se ha demostrado que los receptores D3 que se localizan en la vía estriado-nigral, tienen la función de potenciar el efecto de los receptores D1 sobre la liberación de [³H]GABA, cuando la proteína cinasa II α dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII α) se encuentra bloqueada (Ávalos-Fuentes y cols., 2013). Por otro lado, se ha demostrado la presencia de los receptores D4 en la vía palido-nigral, cuya activación, disminuye la liberación de GABA (Acosta-García y cols., 2009; Cruz-Trujillo y cols., 2013).

Debido a esto, la presencia de la dopamina y de sus diferentes receptores en los GB es imprescindible para el correcto funcionamiento del circuito en cuanto a la activación e inhibición del movimiento. No obstante, el funcionamiento de los GB también es regulado por otro tipo de heteroreceptores (receptores diferentes a la naturaleza de la neurona que los contiene), que participan en la modulación de la neurotransmisión GABAérgica (Maneuf y cols., 1996; Köfalvi y cols., 2005; González y cols., 2006; Cristovão-Ferreira y cols., 2013), lo cual permite la fina regulación de este importante circuito del SNC.

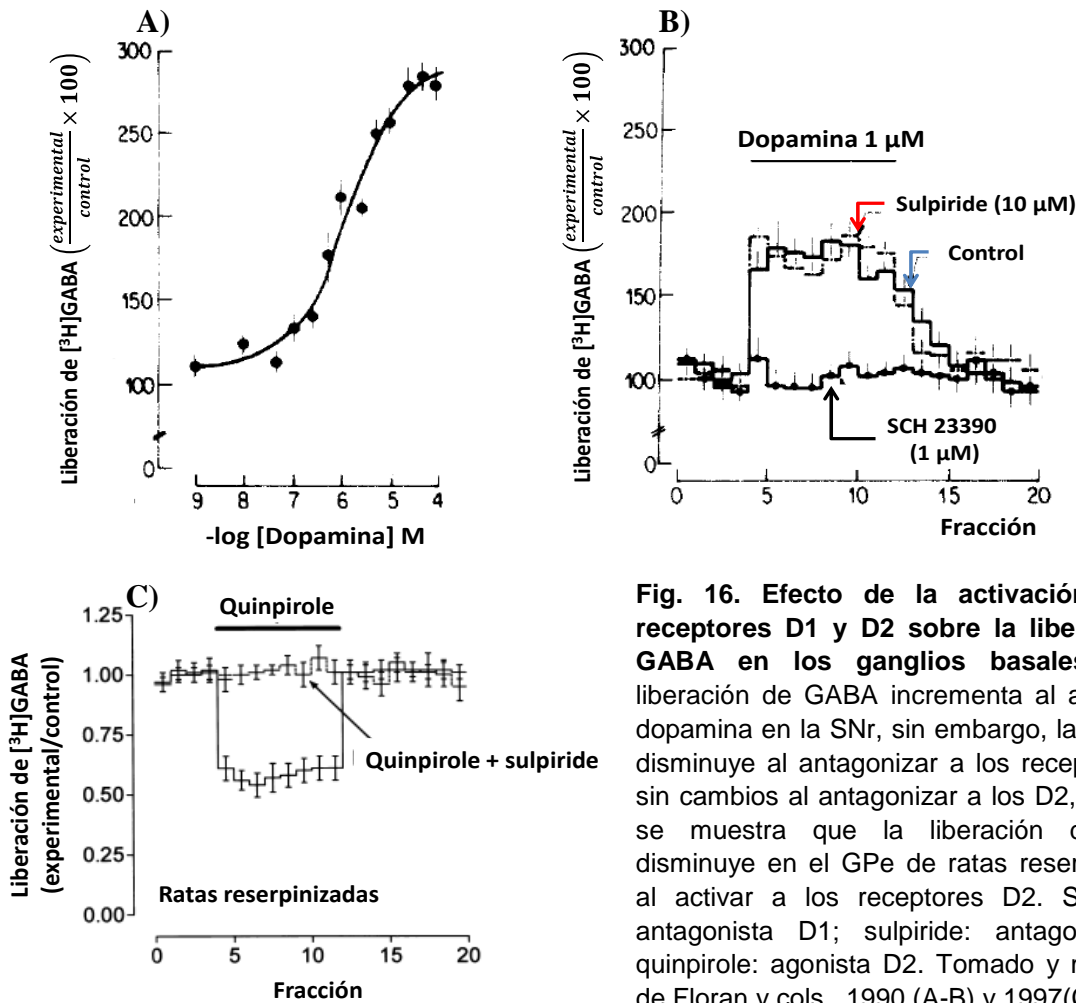


Fig. 16. Efecto de la activación de los receptores D1 y D2 sobre la liberación de GABA en los ganglios basales. A) La liberación de GABA incrementa al administrar dopamina en la SNr, sin embargo, la liberación disminuye al antagonizar a los receptores D1, sin cambios al antagonizar a los D2, B). En C) se muestra que la liberación de GABA disminuye en el GPe de ratas reserpinizadas, al activar a los receptores D2. SCH23390: antagonista D1; sulpiride: antagonista D2; quinpirole: agonista D2. Tomado y modificado de Floran y cols., 1990 (A-B) y 1997(C).

4.3 El sistema endocanabinoide como modulador del sistema nervioso central

El interés hacia el sistema endocanabinoide comenzó cuando se logró aislar al principal componente psicoactivo de la marihuana y del hashish, denominado Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) por Gaoni y Mechoulam (1964). En paralelo a este descubrimiento, se realizaron diversas pruebas en diferentes modelos animales (roedores, primates no humanos) y también en humanos, con la finalidad de estudiar los efectos psicotrópicos y motores de los diferentes componentes de la planta *Cannabis sativa*, fue así como se mostró, que el Δ^9 -THC era el fitocanabinoide responsable de la mayoría de los efectos producidos por el consumo de la

marihuana, tales como la catalepsia, alteraciones motoras, euforia, disforia, ansiedad, alteraciones en las percepciones de tiempo y espacio, eventos de pánico y deterioro en la memoria (Howlett, 2004). Sin embargo, en la década de los 60, aún no se tenía claro el porqué de los diversos efectos producidos por el Δ^9 -THC.

El mecanismo propuesto fue que el Δ^9 -THC actuaba de forma inespecífica, ya que, al ser altamente lipófilo, podría interactuar con la membrana celular y modificar la fluidez y estructura celular (Hillard y cols., 1985). No obstante, las diversas pruebas realizadas con los demás cannabinoides (Δ^8 -THC) -que comparten las mismas características lipofílicas- no mostraban la misma potencia y eficacia del Δ^9 -THC, por tanto, la idea sobre la alteración de la fluidez membranal fue desechada.

No obstante, Howlett (1984), descubrió que el Δ^9 -THC inhibía la formación de AMPc, y en 1988, Devane y cols., descubrieron que el cannabinoide se unía a sitios específicos en el cerebro; estos dos descubrimientos dieron la pauta a un descubrimiento inminente, el Δ^9 -THC debía unirse a un receptor en específico que se localizara en el cerebro y que modulara la concentración de AMPc. Fue en 1990 cuando Matsuda y cols., caracterizaron al receptor CB1, en 1991, Herkenham y cols., demostraron su distribución en el cerebro. Este fue el primer paso en el descubrimiento del sistema endocanabinoide.

Posteriormente, en 1992, se aisló al primer ligando endocanabinoide N-araquidoniletanolamida o anandamida (AEA), a partir de un cerebro de cerdo (Devane y cols., 1992), un año más tarde, se descubrió al receptor CB2 en células del sistema inmune (Munro y cols., 1993), cuya característica principal, al igual que el receptor CB1, es que es un receptor 7TM que se acopla a una $PG_{i/o}$. Finalmente, dos grupos independientes descubrieron al segundo ligando endocanabinoide denominado 2-araquidonilglicerol (2-AG) (Mechoulam y cols., 1995; Sugiura y cols., 1995).

La acción de los dos endocannabinoides sobre los receptores CB1 y CB2, se termina por un mecanismo de transporte hacia el espacio intracelular, seguido del metabolismo de los mismos (Fowler y Ghafouri, 2008). La primera evidencia acerca de un mecanismo de captura de la AEA, fue un año después de su descubrimiento, donde se observó una disminución de AEA extracelular dependiente del tiempo en

células de gliomas (C6) y en células de neuroblastoma N18TG2 (Deutsch y Chin., 1993). Posteriormente se demostró que este mecanismo era específico, saturable y dependiente de la temperatura fisiológica (37 °C) (Di Marzo y cols., 1994). Asimismo, la administración de albúmina o de agentes farmacológicos como el N-(4-Hidroxifenil)-araquidonilamida (AM-404), disminuyen de manera significativa la captura de AEA (Beltramo y cols., 1997), no obstante, hasta el momento, no se ha logrado clonar a dicho transportador, por tanto, los estudios acerca de este mecanismo continúan, ya que dicho transportador, sería un blanco farmacológico importante para regular las concentraciones de endocannabinoides en el medio extracelular y permitir con ello una mayor acción sobre sus receptores.

Una vez que la AEA se localiza en el medio intracelular, es metabolizada por una proteína transmembranal con propiedades serina hidrolasa, la cual se encarga de degradarla a ácido araquidónico y etanolamina (Cravat y cols., 1996), y se denomina amido hidrolasa de los ácidos grasos (FAAH). Esta proteína se encuentra ampliamente distribuida en el cerebro de rata y se localiza principalmente en los cuerpos celulares y dendritas, descrita por primera vez por Deutsch y Chin en 1993.

El metabolismo del otro ligando endocanabinoide (2-AG), ha sido menos estudiado que el de AEA, sin embargo, se tiene conocimiento de que este, es metabolizado por varias proteínas como la ciclooxigenasa 2 (COX-2), lipoxigenasas y monoacilglicerol cinasas (Kosak y Marnett, 2004). Asimismo, el 2-AG puede ser hidrolizado por la FAAH y la monoacilglicerol lipasa (MAGL), la cual, al igual que la FAAH, se encuentra ampliamente distribuida en el SNC, pero, a diferencia de la FAAH que es una enzima postsináptica, la MAGL se localiza en las terminales nerviosas presinápticas.

Desde el descubrimiento del sistema endocanabinoide en la década de los 90's, el interés en el estudio sobre su funcionamiento y modulación no ha disminuido, ya que este sistema regula una gran cantidad de funciones del SNC y SNP. Debido a este constante estudio, se han descubierto otras sustancias endocannabinoides como N-araquidonil glicina, N-araquidonil dopamina o NADA, N-araquidonil serina, N-palmitoil etanolamida o PEA y el noladin éter. Asimismo, se ha propuesto que existe un tercer receptor a cannabinoides (CB3), el cual podría explicar los diversos efectos

independientes de la acción de los receptores CB1 y CB2, ocasionados por los endocannabinoides, tal es el caso del receptor huérfano GPR55.

4.3.1 Papel de los receptores CB1 en los ganglios basales

Los receptores a cannabinoides CB1, son proteínas de 472 (en humanos) y 473 (en rata y ratón) aminoácidos, los cuales se caracterizan por conservar un extremo N-terminal extracelular de 116 a 117 aminoácidos. Asimismo, los receptores de las tres especies de mamíferos, comparten una identidad del 97 al 99 % (Howlett y cols., 2002) y se ha demostrado que los aminoácidos de las posiciones 67 a 68, 75 a 79 y 94, que se localizan en el extremo N-terminal son los que generalmente difieren en los tres tipos de receptores. Es un receptor ampliamente distribuido en el SNC, principalmente en los GB (GPe y SNr), hipocampo y cerebelo (Herkenham y cols., 1990; Tsou y cols., 1998; Silverdale y cols., 2001; Chaves-Kirsten y cols., 2013) (fig. 17).

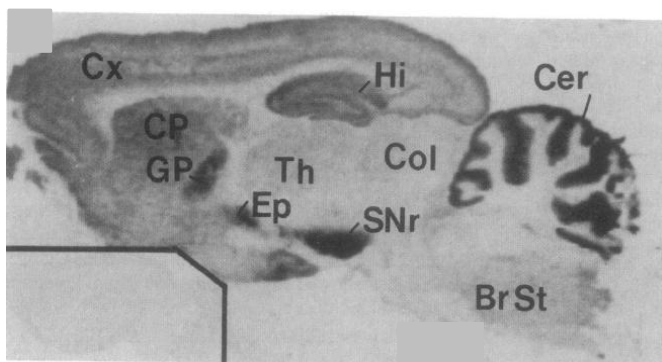


Fig. 17. Expresión de los receptores CB1 en el cerebro de rata. Autorradiografía de los receptores CB1, los cuales son reconocidos por [³H]CP55940, un agonista de los receptores CB1, en un corte sagital de cerebro de rata. Las zonas más oscuras, son densamente pobladas por receptores CB1 (Cx: corteza; Cp: caudado-putamen; GP: globo pálido; Ep: núcleo entopeduncular; SNr: sustancia *nigra reticulata*; Th: tálamo; Hi: hipocampo; Col: colículo; Cer: cerebelo; BrSt: tallo cerebral). Tomado y modificado de Herkenham y cols., 1990.

Debido a que los receptores CB1 se localizan en las terminales presinápticas (Herkenham y cols., 1991; Tsou y cols., 1998; Rodríguez de Fonseca y cols., 2005), y que la AEA y el 2-AG se sintetizan y liberan de la postsinápsis, se considera que el sistema endocanabinoide tiene una señalización retrógrada (Piomelli y cols., 1999). Es por esta característica tan importante, que el receptor CB1 participa en la

modulación de la neurotransmisión, pues su activación en diversos núcleos del SNC, como el estriado, el GPe y la corteza, disminuye la liberación de [³H]GABA y [³H]glutamato (Köfalvi y cols., 2005; González y cols., 2009; Ferreira y cols., 2012), (fig. 18). El mecanismo por el cual se lleva a cabo dicha modulación, se debe a su clásico acople a una PG_{I/O}, por tanto, la activación del receptor CB1 comprende la inhibición de la Ac, disminución en la concentración de AMPc, cierre de los canales de Ca²⁺ y apertura de los canales de K⁺, además de la activación de la cascada de activadora de mitógenos (MAPK) (Piomelli, 2003).

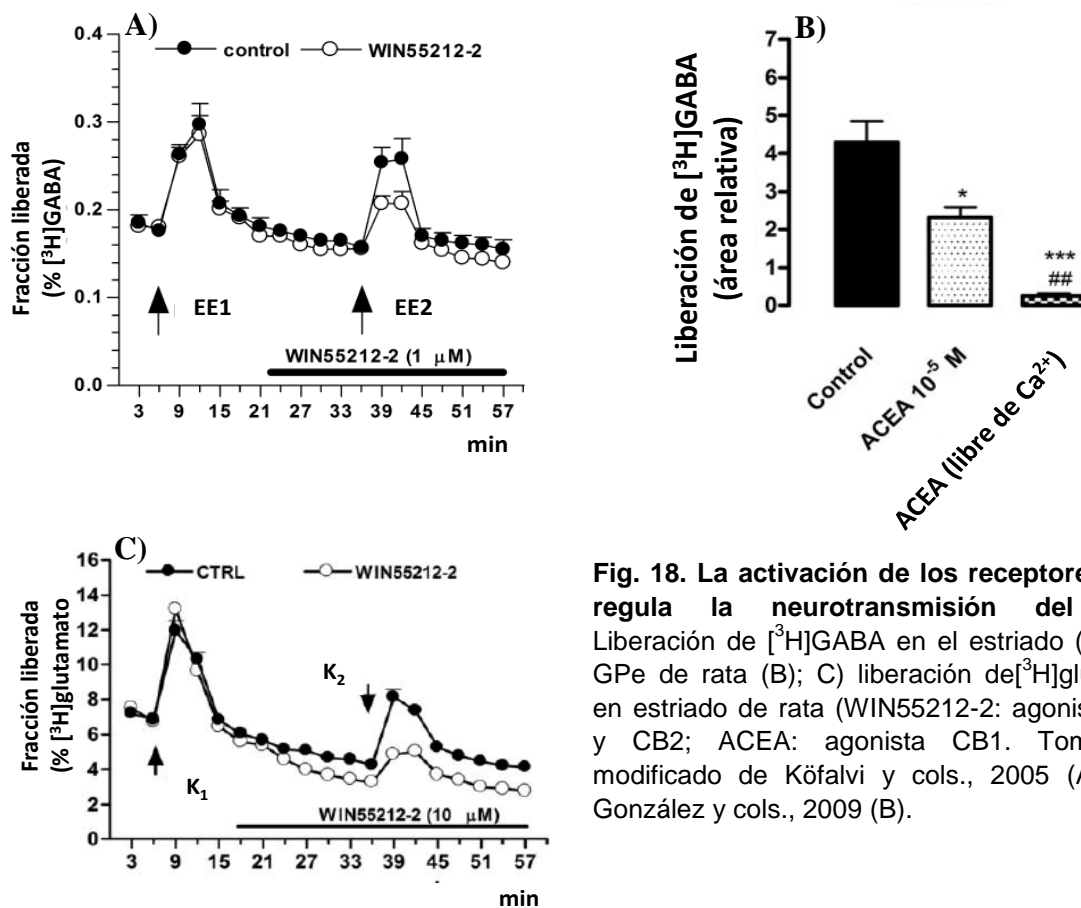


Fig. 18. La activación de los receptores CB1, regula la neurotransmisión del SNC. Liberación de [³H]GABA en el estriado (A) y en GPe de rata (B); C) liberación de [³H]glutamato en estriado de rata (WIN55212-2: agonista CB1 y CB2; ACEA: agonista CB1. Tomado y modificado de Köfalvi y cols., 2005 (A y C); González y cols., 2009 (B).

A pesar de que se trata de un receptor acoplado a una PG_{I/O} (Howlett y cols., 1998), se ha demostrado que puede experimentar acoples a PG_{s/olf} (Jarrahian y cols., 2004; González y cols., 2009) y a G_{q/11} (Lauckner y cols., 2005). Diversos estudios han mostrado que los receptores CB1 pueden interaccionar con otros receptores,

principalmente con el de dopamina D2 (Glass y Felder, 1997; Giuffrida y cols., 1999; Martin y cols., 2008; González y cols., 2009), y con los CB2 (Callen y cols., 2012). La interacción entre ambos receptores, sugiere el cambio de acople a una $PG_{s/olf}$ por parte del receptor CB1, ya que se ha demostrado, que al co-activar a los receptores CB1 y D2, la concentración de AMPc incrementa (Glass y Felder, 1997; Jarrahian y cols., 2004), lo cual explica el incremento en la liberación de GABA en el GPe (González y cols., 2009).

No obstante, los receptores a cannabinoides, también tienen la función de modular otros puntos de la neurotransmisión GABAérgica, tales como la captura de GABA. Se ha demostrado que la activación de los receptores CB1 en rebanadas de GPe de rata, disminuye la captura de GABA de manera significativa (Maneuf y cols., 1996), no obstante, diversos estudios han mostrado efectos contrarios o nulos sobre este mecanismo (Venderova y cols., 2005; Köfalvi y cols., 2005), por lo cual, se necesitan más estudios para elucidar este evento.

El mecanismo por el cual los receptores CB1 podrían disminuir la captura de GABA, hasta ahora no es conocido, sin embargo, estudios previos han mostrado que la activación de la PKA (proteína implicada en la señalización del CB1) disminuye la captura de GABA en el GPe de ratas intactas, por ello se propone que esta proteína podría tener un efecto importante sobre el GAT-1, el cual tiene una alta densidad en el GPe (González y cols., 2006). Sin embargo, la PKA no podría actuar directamente sobre el GAT-1 debido a que el transportador cuenta con un sitio de fosforilación para PKA de manera extracelular (Guastella y cols., 1990). Existen estudios que proponen a la fosfoproteína de 32 kDa reguladora de dopamina y AMPc (DARPP-32) como una proteína importante en la regulación de la Ac en la vía estriado palidal (Svenningsson y cols., 2004) y posiblemente esta proteína es la moduladora de la actividad del GAT-1 (González y cols., 2006).

Se ha demostrado que la activación de los receptores CB1 permite la fosforilación de la DARPP-32 (Borgkvist y cols., 2008) en la treonina 34 (Thr³⁴), lo cual la vuelve en inhibidora de la proteína fosfatasa-1 (PP-1), lo que incrementa la acción del AMPc (Svenningsson y cols., 2004). Se propone que posiblemente, la inhibición de la PP-1 puede participar en la disminución de la actividad del GAT-1, lo

cual explica la inhibición en la captura de GABA observada por la activación de PKA (González y cols., 2006). Asimismo, existen reportes donde se indica que en ciertas condiciones, la activación del receptor CB1 en rebanadas de GPe de ratas intactas, incrementa la formación de AMPc (Maneuf y Brotchie, 1997), hecho que refuerza más la idea que los receptores CB1 podrían disminuir la captura de GABA por esta vía de señalización.

Los receptores CB1 también pueden actuar a través de las subunidades β/γ de la PG (Hillard y Auchampach, 1994; Lauckner y cols., 2005). Las subunidades β/γ pueden modular varios procesos de señalización entre los que se encuentran la modulación de canales iónicos, algunas isoformas de Ac, PLC y la PI3K (Wettschureck y Offermanns, 2005). Debido a esto, se ha propuesto que el receptor CB1 puede activar la vía PLC-PKC, e incrementar la formación de IP3 y de DAG (Gomperts y cols., 2009), los cuales participan en la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares y la activación de la PKC respectivamente (Lauckner y cols., 2005); posiblemente, esta vía de señalización sea la implicada en la inhibición del GAT-1.

En el SNC, se encuentran principalmente dos tipos de células, las neuronas y las células de la glía, las cuales, cumplen una función determinada. Por un lado, las neuronas son las encargadas de transmitir la señal química a través de la denominada “sinapsis”, la cual se forma por una neurona presináptica y una postsináptica. Por otro lado, las células de la glía, cumplen la función de sistema inmune del SNC, además de que son el “soporte” de la compleja red neuronal.

Recientemente, se ha sugerido una comunicación bidireccional entre los astrocitos y las neuronas (Araque y cols., 2001). Se demostró que los astrocitos responden con un incremento en la liberación de Ca^{2+} intracelular cuando ocurre la liberación de glutamato y acetilcolina en las células de Schaffer del hipocampo (Perea y Araque, 2005), este incremento de Ca^{2+} , permite la liberación de los denominados “gliotransmisores”, los cuales, tienen como función la regulación de la excitabilidad neuronal (Araque y cols., 1999). Los astrocitos también presentan diferentes receptores, que en la mayoría de los casos, se encuentran acoplados a la señalización de segundos mensajeros, los cuales, movilizan el Ca^{2+} de los

compartimentos intracelulares; de esta manera se propone que el término clásico de sinapsis debe ser modificado a “sinapsis tripartita” ya que los astrocitos juegan un papel determinante en la regulación de la transmisión de la señal química (Navarrete y Araque, 2008).

Por medio de microscopía electrónica y mediante el uso de anticuerpos dirigidos hacia el extremo N-terminal de los receptores CB1, se demostró que estos receptores a cannabinoides se expresan en astrocitos de estriado de ratas Sprague-Dawley (Rodríguez y cols., 2001). Los receptores CB1 también se localizan en los astrocitos de la corteza, del hipocampo (fig. 19), del haz del cerebro medio, de la amígdala y de las lámina I y II de la médula espinal de ratas Wistar (Moldrich y Wenger, 2000; Salio y cols., 2002). Sin embargo, la participación sobre la modulación de la neurotransmisión, hasta ahora no es clara (Stella, 2010)

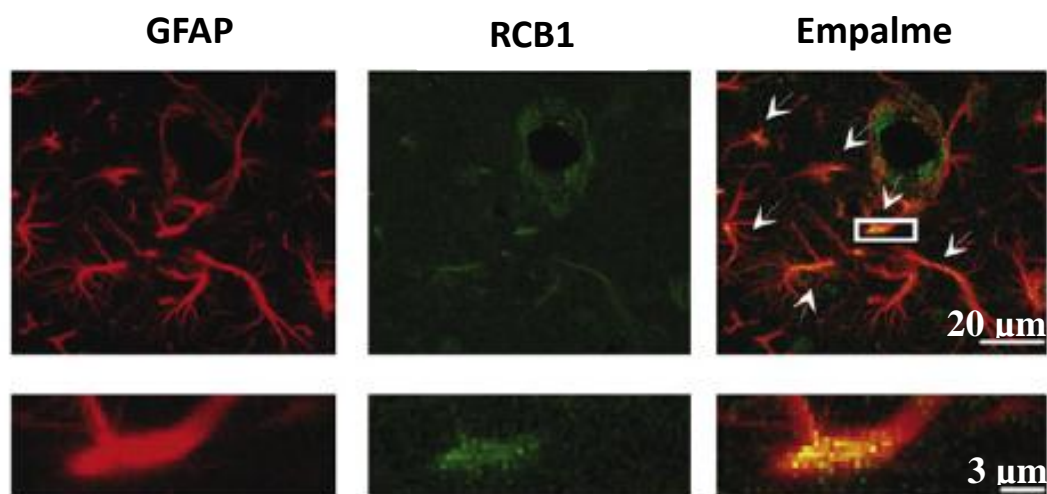


Fig. 19. Localización inmunocitoquímica de GFAP y de los receptores CB1 en astrocitos de la región CA1 del hipocampo de ratón. Las imágenes superiores, muestran la localización de GFAP (rojo), de los receptores CB1 (verde) y el empalme de las fotografías. Las imágenes inferiores, muestran un acercamiento de cada inmunocitoquímica así como de la localización de ambas proteínas. Tomado y modificado de Navarrete y Araque, 2008.

Para el estudio funcional de los receptores CB1 en astrocitos, se han realizado estudios de microscopía de fluorescencia, a través de los cuales y por medio del indicador de Ca^{2+} conocido como fluo-4, se ha demostrado que la activación de estos receptores con 2-AG, AEA y WIN55212-2, incrementa la concentración de Ca^{2+}

intracelular en astrocitos de la región CA1 del hipocampo de ratón, lo cual propone que estos receptores se podrían acoplar a una $PG_{q/11}$ (Lauckner y cols., 2005). Este incremento de Ca^{2+} , induce al astrocito a liberar glutamato, el cual puede activar a los receptores NMDA o metabotrópicos de glutamato de tipo neuronal, lo que permitiría la transmisión neuronal (Navarrete y Araque, 2008; 2010). Asimismo, en rebanadas de la región CA1 del hipocampo de rata, la activación de estos receptores a cannabinoides localizados en los astrocitos, incrementa la duración de descargas epileptiformes inducidas por 4-aminopiridina. Por otro lado, el antagonismo de los CB1 con AM251, si bien no bloquea las descargas, sí disminuye la frecuencia de disparo de los astrocitos de esta región cerebral (Coiret y cols., 2012). Estos eventos, sugieren que los receptores CB1 tienen un papel importante en la modulación de la sinapsis tripartita.

El papel de los receptores CB1 sobre la modulación de la liberación de glutamato astrocítico, ha tomado relevancia en años recientes. Un estudio realizado en gliosomas (astrocitos aislados) de corteza de rata, mostró que la activación de los receptores CB1, incrementa la liberación de [3H]aspartato (un análogo del glutamato) inducida por despolarización con KCl, además de que se registró un incremento en la formación del IP_3 y en la liberación de Ca^{2+} intracelular (Bari y cols., 2011). No obstante, en los GB, no se ha demostrado que los receptores CB1 astrocíticos tengan algún papel en la modulación de la transmisión sináptica.

Los eventos neuroquímicos de liberación y captura modulados por la acción de los receptores CB1, tienen una importante consecuencia sobre el funcionamiento de los GB, lo cual produce cambios sobre los procesos motores. Sañudo-Peña y cols., (1998) han mostrado que la activación los receptores CB1 con CP55940 en el GPe de ratas en condiciones fisiológicas normales, induce conducta de giro ipsilateral al sitio de administración, lo cual sugiere que estos receptores inhiben el disparo de las neuronas palidales. Asimismo, en sujetos de experimentación intactos y reserpinizados, la administración de endocannabinoides produce hipocinesia (Di Marzo y cols., 2000).

A pesar de conocer las consecuencias de la activación de los receptores CB1 en los GB y principalmente en el GPe, aún no se comprende la compleja modulación que estos realizan para disminuir la actividad motora.

4.3.2 El receptor GPR55 como posible modulador de la neurotransmisión en el sistema nervioso central

Una de las principales características que tienen las proteínas pertenecientes a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), es que tienen un papel importante en la transducción de señales desde el medio extracelular hasta el interior de la célula, lo cual permite la correcta función celular así como la regulación de la expresión genética (Savarese y Fraser, 1992).

Una herramienta importante para el estudio de nuevos GPCR, es el uso de la base de datos, denominada “High Throughput Genome” o HTG, que contiene las secuencias genómicas de *Homo sapiens*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana* y *Mus musculus*. Las secuencias incluidas en esta base de datos, pueden contener algunos fragmentos desorganizados, espacios entre fragmentos o algunos errores de secuenciación. Por tanto, esta fuente permite la identificación y caracterización de nuevos genes que pudieran tener una baja expresión, o que se expresan transitoriamente.

A partir de esta base de datos, se logró clonar al gen humano del receptor GPR55, el cual se localiza en el cromosoma 2q37 y codifica para un receptor 7TM de 319 aminoácidos (como en la rata) con dos sitios consenso para N-glicosilación, tres sitios de fosforilación para PKA/PKC y dos sitios específicos de fosforilación para PKC; tiene un porcentaje de identidad importante con otros receptores humanos, tales como el P2Y5 (29 %), GPR23 (30 %), GPR35 (27 %) y CCR4 (23 %) (Sawzdargo y cols., 1999), además de que el ARNm para el GPR55 se localiza en el caudado-putamen (estriado en ratas), sin embargo, no se ha localizado en ninguna de las siguientes estructuras: hipocampo, tálamo, cerebelo, corteza frontal e hígado (Sawzdargo y cols., 1999). No obstante, en el ratón, se ha identificado el ARNm de este receptor en glándula suprarrenal, bazo, tejido adiposo, pulmones, hígado, riñón,

útero, tracto gastrointestinal (TGI), médula espinal, hipocampo, corteza frontal, cerebelo, estriado, hipotálamo y tallo cerebral (Ryberg y cols., 2007). Asimismo, en ratas se ha localizado igualmente en el SNC y en TGI (Baker y cols., 2006). Dichos estudios acerca de la expresión del GPR55 permiten proponer la posible importancia moduladora del GPR55 sobre el SNC.

La función del GPR55 no ha sido completamente esclarecida, sin embargo, estudios realizados en células de riñón humano (HEK-293s) transfectadas con el receptor GPR55, han mostrado que se acoplan a $PG_{12/13}$, debido a que fragmentos peptídicos de $PG_{12/13}$, inhiben la unión de $GTP\gamma S$, lo cual sugiere que estos péptidos interaccionan con el receptor y no permiten el acople a la $PG_{12/13}$. Asimismo, el uso de anticuerpos contra diversos péptidos del extremo C-terminal de las PG, demostraron que las $PG_{12/13}$ se encuentran acopladas a la señalización de estos receptores (Ryberg y cols., 2007), por tanto, la señalización que desencadena dicho receptor, involucra la activación de PG pequeñas como Rho, así como la activación de ERK y la de las MAPK.

Un aspecto importante acerca del estudio del GPR55, se debe a que posiblemente sea el denominado receptor CB3, ya que farmacológicamente, este receptor es activado por algunos cannabinoides, ya sean endógenos, sintéticos o naturales, además de que se ha demostrado en ratones knock out al receptor CB1, que la administración de AEA, WIN55212-2 o THC, estimulan la unión de $GTP\gamma S$ en membranas cerebrales de estos ratones (Breivogel y cols., 2001).

En cultivos de células HEK-293, transfectadas con receptores GPR55, se ha demostrado que la activación de dichas proteínas con el fitocanabinoide THC, el endocanabinoide AEA y con su metabolito estable metanandamida (MEA), induce el incremento de Ca^{2+} intracelular; además, el uso del agonista específico de los receptores CB2 JWH015, también indujo el incremento de Ca^{2+} . No obstante, la administración de los cannabinoides sintéticos WIN55212-2 y CP55940 no produjeron ningún cambio sobre la concentración de Ca^{2+} (Lauckner y cols., 2008).

Un hecho interesante acerca de la farmacología de este posible receptor a cannabinoides, es que puede producir respuestas con los arilpirazoles, tales como el SR141716A y el AM251, los cuales son conocidos antagonistas de los receptores

CB1 (Ross, 2008). En cultivos de células HEK-293 transfectadas con el receptor GPR55, se ha demostrado que el uso de estos fármacos, incrementa la internalización mediada por β -arrestinas, las cuales fueron fusionadas con proteína verde fluorescente. El hecho de que la internalización incrementa, indica que el GPR55 es activado por las moléculas empleadas y que posteriormente, deben ser degradados. Este es un evento de regulación importante en todos los GPCR. No obstante, en este estudio se propone que el CP55940 inhibe la acción del SR141716 y del AM251, lo cual propone que este agonista CB1, sea un antagonista GPR55 (Kapur y cols., 2009). Asimismo, otra sustancia cannabinoide no psicotrópica conocida como canabidiol, puede jugar el papel de antagonista de estos receptores (Ryberg y cols., 2007; Henstridge y cols., 2010)

A pesar de la farmacología parecida a los receptores a cannabinoides, el receptor GPR55 comparte un bajo porcentaje de identidad con los receptores CB1 (13.5 %) y CB2 (14.4 %), aunado a la falta de la clásica “bolsa de unión de cannabinoides” de los receptores CB1 y CB2 (Petitet y cols., 2006).

Debido al hecho de que los agonistas de los receptores CB1 y CB2 son derivados lipídicos y que el 2-AG puede ser intermediario en varias rutas metabólicas, el grupo de Sugiura, se dio a la tarea de buscar un posible agonista lipídico para el GPR55. Estudiaron el efecto de diferentes lisolípidos sobre la función de los GPR55 transfectados en células HEK-293 y si estos, podían modular la cascada de las ERK. Oka y cols., (2007) demostraron que la adición de lisofosfatidilinositol (LPI) en los cultivos celulares transfectados con GPR55, incrementa la fosforilación de ERK, mientras que la adición del LPI en el cultivo sin transfectar no produce cambios. Debido a estos datos, se sugiere que el agonista endógeno de los receptores GPR55 es el LPI, el cual, a pesar de ser un lípido, no es considerado un endocannabinoide, es por ello que hasta ahora, la pregunta acerca de si el GPR55 es el receptor CB3, continua abierta (Ross, 2008).

Debido a que el ARNm del GPR55 se expresa en una amplia variedad de tejidos, se sugiere que, al igual que el receptor CB1, se encuentra involucrado en la regulación de una gran variedad de procesos fisiológicos que pueden ser desencadenados por sustancias implicadas en la modulación endocannabinoide y

también por el LPI (Henstridge y cols., 2010), tales como la modulación de los procesos nociceptivos, ya que estudios en ratones knock out para GPR55, han reportado una reducción en la inflamación y dolor neuropático (Staton y cols., 2008), además de un incremento en la masa ósea a través de la activación de Rho y ERK (Whyte y cols., 2009).

Los receptores GPR55 también pueden participar en el desarrollo prenatal pues se ha mostrado que a partir del día 10 de gestación de ratas, los GPR55 incrementan de manera significativa. Se propone que este incremento se debe a que dicho receptor participa en la proliferación celular (Fonseca y cols., 2011).

Debido a que el GPR55 se acopla a una $PG_{12/13}$ y que incrementa la actividad de ERK y la vía MAPK (Anavi-Goffer y cols., 2012), se ha propuesto y demostrado que estos receptores tienen un papel importante en la regulación de la proliferación celular (Whyte y cols., 2009). Anteriormente se ha demostrado por medio de espectrofotometría de masas por electroespray de ionización (ESI-MS) basado en la detección de lípidos, que en muestras de sangre de pacientes con cáncer de ovario y endometrial, presentan niveles altos de LPI (Xiao y cols., 2000). Posteriormente, se demostró en diferentes líneas celulares cancerígenas y por medio de PCR, que los receptores GPR55 se presentan de manera importante en la superficie de dichas líneas celulares; asimismo, la activación de estos receptores con su endógeno LPI, incrementa la unión de GTP γ S, así como la migración, orientación y polarización de las células cancerígenas (Ford y cols., 2010).

De la misma forma, el grupo de Sánchez demostró por medio de PCR, que el receptor GPR55 incrementa su expresión en tumores de cáncer de mama, por tanto, proponen a este receptor, como marcador de este tipo de cáncer, ya que al incrementar la densidad del GPR55, los pronósticos de recuperación para las pacientes son muy bajos (Andradas y cols., 2011). Asimismo, este grupo de trabajo demuestra que la proliferación celular se realiza a través del incremento en la fosforilación de ERK.

Debido a lo anteriormente mencionado, se propone que el GPR55 en el sistema periférico, participa en la proliferación celular y también en eventos inflamatorios a través de la vía MAPK; asimismo, incrementa la concentración de IP_3

y de Ca^{2+} intracelular, sin embargo, el papel funcional del GPR55 a nivel de SNC aún no es claro. Un estudio reciente realizado por el grupo de Rusakov, demuestra por medio de electrofisiología en célula entera y de análisis óptico cuantitativo de Ca^{2+} , que los receptores GPR55 localizados en las neuronas piramidales, al ser activados con LPI, incrementan la probabilidad de liberación de glutamato de la región CA3 a la CA1 del hipocampo, lo cual sugiere que este receptor huérfano, puede modular eventos de liberación en el SNC (Sylantsev y cols., 2013). Sin embargo, la investigación acerca de la funcionalidad del GPR55 en el SNC continúa, con el objetivo de demostrar los diferentes eventos de modulación que realiza y de postularlo como un blanco terapéutico en las diferentes enfermedades neurodegenerativas.

5 JUSTIFICACIÓN

Los receptores a cannabinoides del tipo CB1 y GPR55 se encuentran localizados ampliamente en el sistema nervioso central sobre todo en los ganglios basales, por tanto, se propone que participan en el control de la actividad motora. Estudios recientes han mostrado que los receptores CB1 participan en la regulación de la neurotransmisión GABAérgica de la vía estriado palidal ya que disminuyen la captura de GABA en el globo pálido externo de sujetos de experimentación, sin embargo, hasta ahora no se conoce el mecanismo por el cual se lleva a cabo este tipo de regulación; debido a ello se propone que el estudio de las principales vías de señalización que participan en la neurotransmisión del sistema nervioso central como son las vías Ac-PKA y PLC-PKC, puede llevar al entendimiento de esta regulación y así conocer cómo los receptores CB1 regulan la actividad motora.

Por otro lado, y a pesar de su identificación en el sistema nervioso central, la acción fisiológica de los receptores GPR55 en el globo pálido externo, específicamente sobre la neurotransmisión GABAérgica no se conoce, debido a ello, su posible participación en el control motor no se ha explorado. Es por ello que se propone el estudio funcional de este receptor y su posible participación en la captura de GABA, lo cual ampliará el interés y la comprensión sobre la neuromodulación endocanabinoide en los procesos motores.

El estudio de estos dos receptores a cannabinoides en el globo pálido externo sobre la captura de GABA, permitirá una mayor comprensión de los mecanismos de regulación en el sistema nervioso central y sobre la compleja regulación motora, además, propondrá de manera más precisa al sistema endocanabinoide como blanco terapéutico en las enfermedades neurodegenerativas de los ganglios basales.

6 HIPÓTESIS

La activación de los receptores a cannabinoides CB1 y GPR55, disminuye la actividad motora de rata por la inhibición de la captura de GABA en el globo pálido externo.

7 OBJETIVO GENERAL

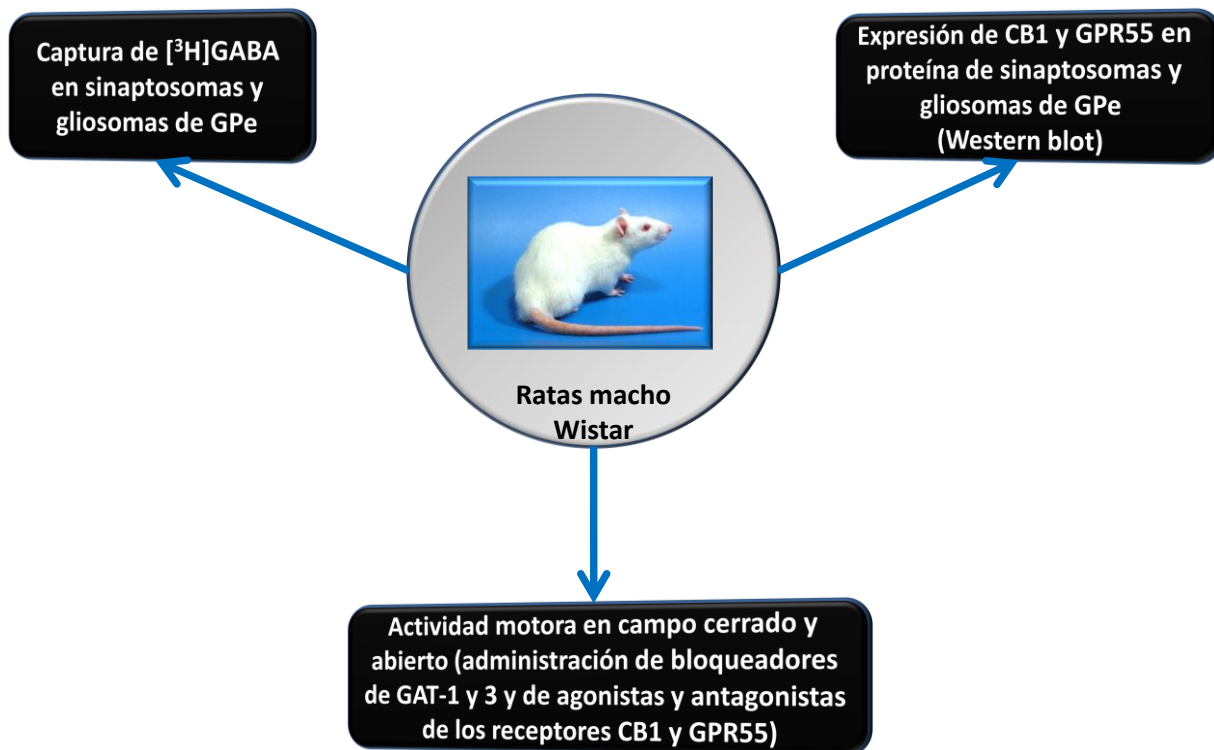
Estudiar el papel de los receptores a cannabinoides CB1 y GPR55 sobre la captura de GABA en el globo pálido externo de rata y las consecuencias motoras que se darán por su activación.

7.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Estudiar el efecto del bloqueo del GAT-1 y del GAT-3 sobre la captura de GABA en sinaptosomas y gliosomas de globo pálido externo de ratas intactas.
2. Estudiar el papel de los receptores CB1 y GPR55 sobre la captura de GABA y la participación de la vía de señalización Ac-PKA en el globo pálido externo de rata.
3. Estudiar el efecto del bloqueo de la vía de señalización PLC-PKC sobre los efectos en la captura de GABA al activar a los receptores CB1 y GPR55 en el globo pálido externo de rata.
4. Evaluar la actividad motora de ratas en condiciones fisiológicas normales después de la activación de los receptores CB1 y GPR55 en el globo pálido externo.

8 METODOLOGÍA

8.1 Diagrama general de trabajo



8.2 Fármacos de estudio

Los fármacos que se utilizaron durante las pruebas conductuales y neuroquímicas son los siguientes: ACEA (agonista CB1; $K_i = 1.4$ nM), AM251 (antagonista CB1; $K_i = 8$ nM y agonista GPR55; $K_i = 39$ nM), WIN55212-2 (agonista no selectivo CB1/CB2; $K_i = 62.3$ nM) los cuales fueron obtenidos de Tocris, mientras que LPI (agonista GPR55), ácido nipecótico (bloqueador inespecífico de GATs), SKF89976A (bloqueador GAT-1; $IC_{50} = 0.64$ μM), SNAP5114 (bloqueador GAT-3; 5 μM), forskolina o FSK (activador de la adenilato ciclasa), 8-Br-AMPC (activador de la PKA), PMA (activador de la PKC), Gö6983 (inhibidor selectivo de la PKC- α) fueron obtenidos de Sigma.

8.3 Sujetos de experimentación

Para los estudios neuroquímicos y bioquímicos, se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar provenientes del bioterio del CINVESTAV-IPN. Por otro lado, las ratas empleadas en las pruebas conductuales, provinieron del bioterio Claude Bernard de la BUAP y se mantuvieron en el vivario del Laboratorio de Neurofarmacología. Los sujetos se utilizaron con un peso de 230 - 250 g y fueron alojados en cajas de acrílico transparente (5 ratas por caja), y se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura ($21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$) y humedad (20 %), ciclos luz-oscuridad 12/12 h, con libre acceso de agua y alimento. El uso y cuidados de los animales se realizaron conforme a lo establecido en la Norma mexicana 062-ZOO-1999, a los ordenamientos establecidos en la guía National Research Counsel (NRC), al comité de investigación de usos de animales de laboratorio de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y al comité de cuidado de animales del CINVESTAV-IPN. La sustentante de este trabajo, obtuvo la certificación para el uso y manejo de animales de laboratorio, expedido por el bioterio Claude Bernard de la BUAP.

8.4 Obtención de las estructuras de estudio

8.4.1 Obtención de sinaptosomas de globo pálido externo de ratas

Se realizó eutanasia a ratas macho Wistar intactas, se extrajeron los cerebros y se realizaron cortes coronales de 300 μm de espesor. Una vez obtenidos los cortes y por medio de un sacabocados ($D= 1\text{ mm}$), se disecaron rebanadas de GPe, las cuales se mantuvieron en solución Krebs-HEPES o K-H (composición: NaCl 127 mM, KCl 3.73 mM, MgSO_4 1.18 mM, KH_2PO_4 1.18 Mm, CaCl_2 1.8 mM, HEPES 20 Mm, dextrosa 11 mM pH=7.4 bajo saturación con carbógeno) a 4 $^{\circ}\text{C}$.

Terminada la disección se retiró el K-H frío y se adicionó a las rebanadas de GPe 1 mL de solución de sacarosa 0.32 M a 4 $^{\circ}\text{C}$ para homogeneizarlas a 450 rpm con diez incursiones del émbolo al tubo de homogeneización para romper las membranas celulares. Dicho homogenado se centrifugó a 3000 rpm a 4 $^{\circ}\text{C}$ durante 15 min en una centrífuga marca Beckman para sedimentar los núcleos. El

sobrenadante se recuperó y este se centrifugó nuevamente a 15000 rpm a 4 °C durante 35 min en una centrífuga Sorvall RC5, en este paso, se obtuvieron los sinaptosomas de GPe más otros organelos como lisosomas. Terminado el tiempo de centrifugación, la pastilla se recuperó y se resuspendió en 1 mL de sacarosa 0.32 M, posteriormente, el resuspendido se colocó en una cama de sacarosa 0.8 M (4 °C) y nuevamente se centrifugó a 15000 rpm a 4 °C durante 35 min en una centrífuga Sorvall RC5 para purificar los sinaptosomas de otros organelos. Por último, la pastilla que se formó se recuperó y se resuspendió en 1 mL de K-H a 37 °C para activar los sinaptosomas obtenidos. Por medio de microscopía electrónica, se verificó que los sinaptosomas obtenidos no tuvieran contaminantes celulares (fig. 20).

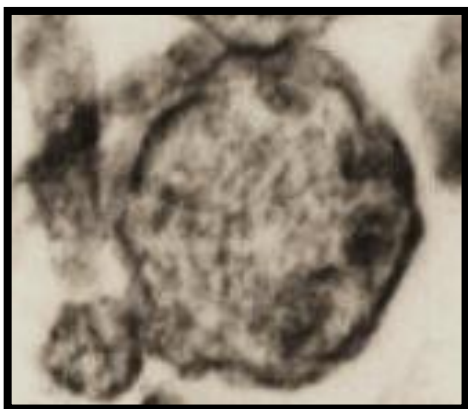


Fig. 20. Fotomicrografía de un sinaptosoma de globo pálido externo de rata. Se observa el sinaptosoma formado el cual contiene en su interior una gran cantidad de vesículas que almacenan neurotransmisor. Laboratorio del Dr. Benjamín Florán.

8.4.2 Obtención de gliosomas de GPe

Los gliosomas se obtuvieron por el método propuesto por Bari y cols. (2011). El GPe obtenido fue homogeneizado en 2 mL de sacarosa 0.32 M a 450 rpm (4 °C) con doce incursiones del émbolo. Posteriormente, el homogenado se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido, se diluyó en 2 mL de sacarosa 0.32 M (volumen final 4 mL) y posteriormente, esta solución se colocó cuidadosamente en un gradiente de Percoll® previamente elaborado (2%, 6%, 10% y 20% en sacarosa 0.32 M pH 7.4) y se centrifugó a 20000 rpm/5 min a 4°C. La fracción gliosomal se localiza en la capa formada entre los gradientes de 2 y 6 % de Percoll®, esta capa se tomó y posteriormente, se diluyó en 40 mL de K-H. Nuevamente, la solución formada se centrifugó a 16000 rpm/30 min a 4°C y el pellet

formado fue recuperado y resuspendido en K-H para activar a los gliosomas. Para determinar la pureza de los gliosomas, se realizaron estudios de western blot donde se verificó la presencia de la proteína GFAP la cual es una proteína constitutiva de astrocitos (fig. 21).



Fig. 21. Expresión de GFAP en Gliosomas de globo pálido externo de rata. Se muestra la expresión de GFAP en 50 µg de proteína de diferentes muestras. C: cerebro; R: riñón; M: músculo; S: sinaptosomas; G: gliosomas

8.5 Estudios neuroquímicos

8.5.1 Captura de [³H]GABA en rebanadas de globo pálido externo de ratas

Los estudios de captura de [³H]-GABA se realizaron con el método utilizado por González y cols., en 2006.

Se colocaron 2 rebanadas de GPe en cámaras de captura conteniendo 5 mL de solución K-H a 37°C incubándola durante 30 minutos para su estabilización.

Una vez terminado el período de incubación, la solución se reemplazó por una solución fresca de K-H con 0.5 µL de [³H]-GABA más el fármaco a estudiar (ACEA). El período de incubación con la marca radiactiva fue de 30 minutos; terminado este período, las rebanas se lavaron con 4 cambios de K-H frío (4°C) para eliminar el exceso de marca radiactiva.

Una vez retirado el último lavado con K-H frío, las muestras se transfirieron a viales (2 rebanadas por cada vial) y se les agregó una solución de HCl 1N para posteriormente someterlos a sonicación durante 30 minutos (10 min con calor y 20 min sin calor) para solubilizarlas y de esta manera poder recuperar la marca radiactiva, una vez terminado este período, se agregaron 10 mL de líquido de centelleo para determinar la radiactividad y su posterior cuantificación en el aparato de centelleo líquido.

8.5.2 Captura de [³H]GABA en sinaptosomas y gliosomas de globo pálido externo de ratas

A partir de la suspensión de sinaptosomas y gliosomas obtenida, se resuspendieron 800 µL en 5400 µL de K-H a 37 °C. Esta preparación se estabilizó a 37 °C durante 10 min y terminado este tiempo, se colocaron 270 µL de la solución en cada tubo de ensayo (según el experimento que se realizó).

Una vez colocados los 270 µL en los tubos, se adicionaron 10 µL del fármaco a estudio y 20 µL de [³H]GABA a una concentración de 7.5 µM. La preparación anterior se incubó (10 min en el caso de sinaptosomas y 5 min para los gliosomas) a 37 °C y terminado el tiempo de incubación la reacción se detuvo en hielo.

Las preparaciones se filtraron en un papel filtro previamente colocado en polietilenimina al 0.3 %, finalmente, cada porción del papel filtro se transfirió a viales y se adicionaron 7 mL de líquido de centelleo. Para liberar el [³H]GABA del papel filtro se reposaron los viales durante 2 horas. Por último, se cuantificaron las desintegraciones por minuto en un contador de centelleo líquido (Beckman LS-6500) (fig. 22).

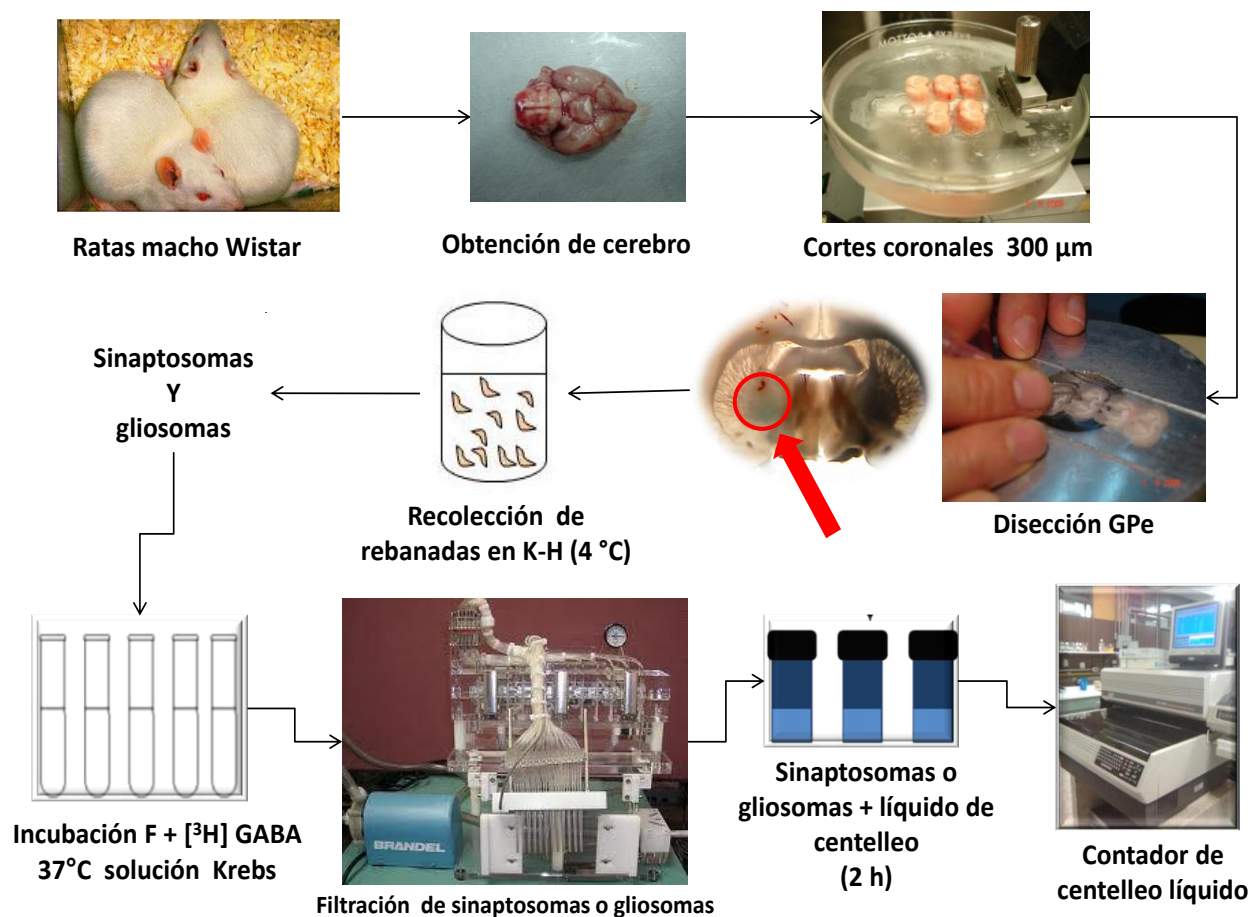


Fig. 22. Metodología para medir la captura de [³H]GABA en sinaptosomas y gliosomas de GPe de ratas intactas. Descripción en el texto.

8.6 Estudios bioquímicos

8.6.1 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Se obtuvieron sinaptosomas y gliosomas de GPe, los cuales se resuspendieron en RIPA con inhibidores de proteasas (cOmplete® y PMSF 10 mg/mL) (RIPA 500 µL + 10 µL cOmplete®+ 5 µL de PMSF) e inhibidores de fosfatasa (NaF 100 mM, Ortovanadato de Na 1 mM). Una vez adicionados los inhibidores, la solución formada se reposó por 15 minutos en hielo. Pasado este tiempo, las muestras se resuspendieron 16 veces y se cuantificó la cantidad de proteína por el método de Bradford como se indica en la tabla 1.

Tabla 1 Curva de calibración para la obtención de proteínas por el método de Bradford

Curva	Álbumina (μL) (BSA; 1 mg/mL)	H ₂ O (μL)	H ₂ O (llevar a 800 μL)	Bradford (μL)
0	0	20	780	200
2.5	2.5	17.5	780	200
5	5	15	780	200
7.5	7.5	12.5	780	200
10	10	10	780	200
12.5	12.5	7.5	780	200

Las muestras se incubaron durante 15 min y posteriormente se leyeron a 595 nm en una lámpara visible de un espectrofotómetro Beckman Coulter.

Se tomaron 3 μL de la muestra de sinaptosomas y 4 μL de gliosomas, se adicionaron 17 y 16 μL de agua para aforar a 20 μL y posteriormente se adicionaron 780 μL más de agua y 200 μL de reactivo de Bradford. Por último, las muestras se leyeron a 595 nm y se obtuvo la cantidad de proteína en cada muestra.

8.6.2 Detección de proteínas por Western blot

Una vez cuantificada la proteína, se adicionó el buffer de muestra 4x (Glicerol 50%, Tris-HCl 125 mM, pH 6.8, SDS 4 %, Azul de bromofenol 0.08 %, β -mercaptoetanol 5 %), la proteína se hirvió a 99°C por 10 minutos, posteriormente, las muestras se congelaron a -80 °C para los ensayos de western blot, los cuales consistieron en lo siguiente (fig. 23):

1. Se preparó el gel de poliacrilamida al 10 %
2. Se cargaron los carriles con la proteína, así como el marcador de peso (Dual Color 4 μL).
3. La electroforesis se realizó a 80 V por 10 min y posteriormente a 100 V durante 90 min o hasta que la proteína migró al fondo del gel.
4. Antes de terminar la electroforesis, las membranas de PVDF se activaron durante 1min en MeOH concentrado, se realizaron 2 lavados de 5 minutos con

agua miliQ y se colocaron en buffer de transferencia junto a las almohadillas de transferencia.

5. Al término de la electroforesis, se obtuvieron los geles de poliacrilamida y se montó el “sándwich” para la transferencia húmeda en el siguiente orden (de abajo hacia arriba): almohadilla, papel filtro, gel de poliacrilamida, membrana de PVDF, papel filtro y almohadilla. La transferencia se realizó durante 4 h a 180 mA.
6. Una vez terminada la transferencia, las membranas se colorearon con rojo de Ponceau para verificar la correcta transferencia, posteriormente se lavaron con agua y se reactivaron con MeOH concentrado (1 min), agua 2 lavados (5 min) y TBS-tween 0.1 % 2 lavados (5 min).
7. Posterior a la reactivación, las membranas se bloquearon con albúmina (BSA) al 5 % durante tres horas a temperatura ambiente (para ocupar espacios inespecíficos).
8. Las membranas se retiraron del bloqueo y se incubaron con el anticuerpo primario disuelto en BSA 0.25 %- TBS-tween 0.1 % durante doce horas a 4 °C (tabla 2).
9. Terminado el tiempo de incubación, el anticuerpo primario se retiró y las membranas se lavaron 4 veces (5 min cada lavado) con TBS-Tween 0.1 %.
10. Las membranas se incubaron con anticuerpo secundario disuelto en BSA 0.25 %- TBS-tween 0.1 % a temperatura ambiente (tabla 3). El anticuerpo secundario se lavó 4 veces (5 min c/u) con TBS-Tween 0.1 %.
11. La membrana se tiñó posteriormente con ECL-plus (General Electric) durante 3 min [1 mL solución A (luminol) + 25 µL solución B (peróxido)] y se reveló por el método de Kodak.

Tabla 2 Anticuerpos primarios utilizados para el reconocimiento de proteínas

Anticuerpo 1°	Descripción	Origen	Dilución	Marca
Anti-cannabinoid receptor I	Policlonal	Conejo	1:500	Abcam
Anti-GPR55	Policlonal	Conejo	1:100	Bioss
Anti-actina	Policlonal	Ratón	1: 250	Elaborado en CINVESTAV
Anti-GFAP	Policlonal	Ratón	1:250	Millipore

Tabla 3 Anticuerpos secundarios utilizados para la visualización de proteínas

Anticuerpo 2°	Descripción	Origen	Dilución	Marca
Anti-conejo	Acoplado a peroxidasa	Cabra	1:2000 (para CB1 y GPR55)	Invitrogen
Anti-ratón	Acoplado a peroxidasa	Cabra	1:4000 (para actina) 1:2000 (para GFAP)	Invitrogen

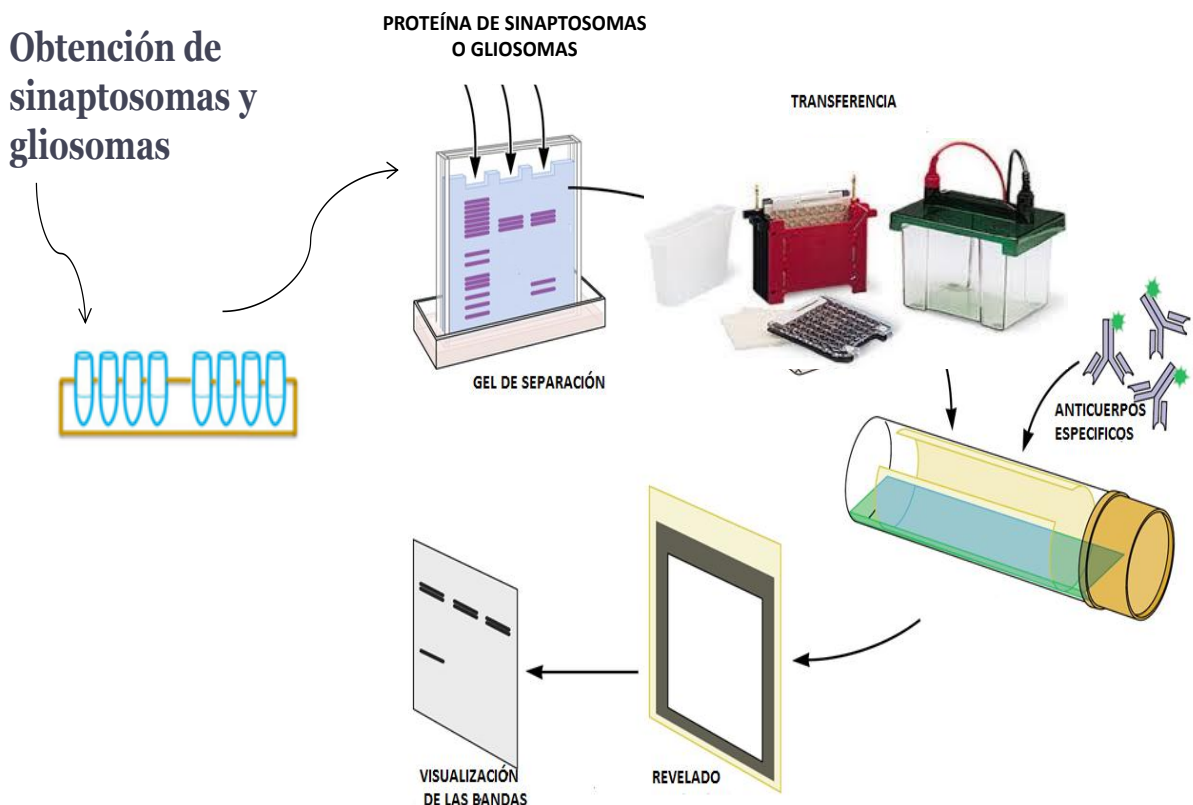


Fig. 23. Pasos realizados para la detección de los receptores CB1 y GPR55 en proteína de sinaptosomas y gliosomas de globo pálido externo de ratas. Se detalla cada paso en el texto.

8.7 Cirugía estereotáxica

8.7.1 Implante de cánula en el GPe de ratas intactas

Con la finalidad de evaluar la función de los receptores CB1 y GPR55 en el globo pálido de ratas en condiciones fisiológicas normales, se realizó el implante de una cánula de acero inoxidable por medio de cirugía estereotáxica. Las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de Ketamina/Xilasina (75 y 10 mg/kg respectivamente) y posteriormente se colocaron en un aparato para cirugía estereotáxica marca Stoelting. Las coordenadas utilizadas para localizar el GPe, en base al atlas de Paxinos y Watson (1998) fueron las siguientes: AP: -0.2 mm, L: - 2.9 mm con respecto a bregma y la profundidad (P) de -3.8 mm con respecto a la dura madre.

La cánula se fijó al cráneo de las ratas con un tornillo de acero inoxidable y acrílico dental. Posteriormente, las ratas tuvieron los cuidados postoperatorios

adecuados y su recuperación constó de siete días para que después se sometieran a las pruebas motoras.

8.8 Estudios conductuales

8.8.1 Evaluación de la conducta de motora en campo cerrado

Siete días posteriores al implante de cánula en el GPe, los sujetos de experimentación se sometieron al modelo de las cajas de actividad motora, el cual consta de una caja de acrílico de 44 cm de largo por 22 cm de ancho y 22 cm de altura de color negro (fig. 24). La parte inferior de la caja consta de una rejilla y en las paredes de la caja están distribuidos ocho fotodiodos a través de los cuales pasa un haz de luz infrarroja a lo ancho de la caja. Cada vez que la trayectoria de la luz se interrumpe por algún movimiento (acicalación, enderezamiento, giros) o desplazamiento (deambulación de un extremo a otro de la caja) del animal, estos se contabilizan en un dispositivo electrónico que se encuentra adaptado a la parte superior de la caja y que almacenará los datos obtenidos en la memoria para la posterior lectura. Cabe señalar que un movimiento se registra cuando la rata interrumpe un solo haz de luz, mientras que se registrará un desplazamiento cuando la rata interrumpa todos los haces de luz de la caja.

El día de la prueba, los sujetos fueron administrados intrapalidalmente con 1 μ L de los diversos fármacos de estudio (ACEA [1 μ M], LPI [10 μ M], SKF89976A [10 μ M], SNAP5114 [10 μ M] o sus combinaciones ACEA/SNAP, LPI/SKF, ACEA/LPI) o con vehículo (DMSO 0.001%). La infusión del fármaco se realizó durante 3 minutos (0.33 μ L/min), terminado el tiempo de administración, el inyector permaneció durante un minuto más para asegurar la perfusión del fármaco o vehículo y posteriormente los animales se introdujeron a las cajas durante una hora. Se graficó el número de desplazamientos y el número de movimientos de cada animal.



Fig. 24. Cajas de actividad motora. El haz de luz infrarroja producido por los ocho fotodiodos, permite registrar los movimientos y desplazamientos de los sujetos de experimentación. Laboratorio de Neurofarmacología.

8.8.2 Evaluación de la conducta motora en el modelo de campo abierto

La conducta motora de los sujetos de experimentación fue evaluada en el modelo de campo abierto, el cual consta de una caja de madera de 60 cm por 60 cm y altura de 1m, cuya base está dividida en 9 cuadros de 20 cm por 20 cm (fig. 25).

La administración de los fármacos se realizó de la misma manera que en el campo cerrado (0.33 μ L/min durante 3 min). Las ratas se situaron en el cuadro central y se videograbaron durante 15 minutos. Al finalizar la evaluación de cada rata, la caja de madera se limpió con una mezcla de agua y alcohol para eliminar olores que pudieran perturbar la actividad de la siguiente rata.

Posteriormente, los videos obtenidos fueron observados para registrar el número de cuadros visitados, de erguidos y de torsiones que son parámetros que hablan acerca de la capacidad de los sujetos de experimentación de realizar un movimiento normal o deficiente.

Una vez finalizadas las pruebas conductuales, los sujetos de experimentación se sometieron a eutanasia, se obtuvo el cerebro y este se fijó en paraformaldehído (4 %), posteriormente, se realizaron cortes coronales de 250 μ m para verificar la posición de la cánula; solo aquellos animales que tuvieron la cánula en el GPe, fueron consideradas en el análisis de la actividad motora.



Fig. 25. Modelo de campo abierto. En este modelo conductual, se videograbo al sujeto de experimentación y se registró el número de cuadros visitados (la base se divide en 9 cuadros de 20*20 cm), el número de erguidos y el número de torsiones. Laboratorio de Neurofarmacología.

9 RESULTADOS

9.1 Efecto de la activación de los receptores CB1 sobre la captura de GABA en rebanadas de globo pálido externo de ratas intactas

Maneuf y cols. (1996) mostraron que la activación de los receptores CB1 en el GPe de ratas, disminuía la captura de GABA de manera importante, sin embargo otros grupos de trabajo mencionan que el receptor CB1 carece de actividad sobre dicha captura en el GPe (Venderova y cols., 2005). Para determinar el papel de los receptores CB1 sobre la captura de GABA, los primeros experimentos de captura de GABA se realizaron en rebanadas de GPe de ratas intactas con el método de captura descrito por González y cols. (2006). Se realizó una curva concentración-respuesta en el GPe de sujetos de experimentación intactos con diferentes concentraciones de ACEA (0.01 μ M, 0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M y 100 μ M), un agonista específico de los receptores CB1 ($K_i = 1.4$ nM) y se cuantificó la captura de GABA radiactivo en cada una de las concentraciones. En la figura 26 se observa la curva logarítmica de las concentraciones utilizadas, la cual muestra una disminución de la captura de GABA de manera concentración dependiente al agonista empleado, asimismo, se obtuvo una IC_{50} de 0.11 μ M (obtenida a través de una regresión no lineal en el programa Prism GraphPad Software 4.0, San Diego, CA, USA). Dicho resultado permite proponer que la activación de los receptores CB1 inhibe la captura de GABA tal y como lo demostró Maneuf y cols. (1996). No obstante, no se sabe aún por qué estos receptores a cannabinoides disminuyen dicho evento de la neurotransmisión GABAérgica.

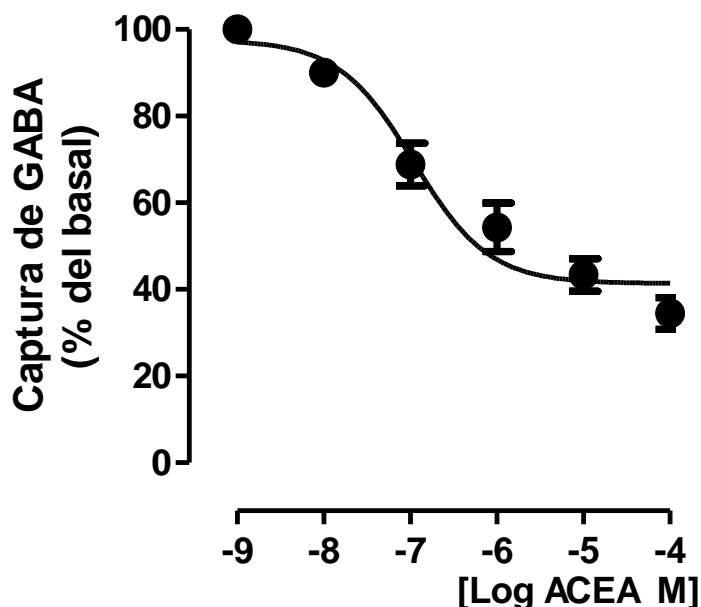


Fig. 26. Captura de GABA en rebanadas de globo pálido externo de ratas intactas. La activación de los receptores CB1 inhibe la captura de GABA de manera concentración dependiente. Los valores son el promedio + ESM determinado en 3 experimentos con 4 réplicas cada uno.

9.2 Participación del GAT-1 y GAT-3 sobre la captura de GABA en el globo pálido externo de ratas intactas.

Se ha demostrado que la activación de los receptores CB1 disminuye la captura de GABA en el GPe, sin embargo, no se tienen reportes sobre el mecanismo que se realiza para inhibir dicho proceso, ni tampoco se tiene información acerca del transportador de GABA que inhiben dichos receptores. Debido a ello, un aspecto importante fue la caracterización funcional de los GATs que según previos reportes se localizan en el GPe (Galván y cols., 2010). Para cumplir con este objetivo, se midió la captura de GABA en sinaptosomas y gliosomas de GPe de ratas intactas, siguiendo la metodología propuesta por Bahena-Trujillo y Arias-Montaña en 1999.

Se realizó la incubación de los sinaptosomas y gliosomas de GPe con [³H]GABA ([10] y [30 μM], respectivamente) a diferentes tiempos (1, 5, 10, 15 y 20 min para gliosomas y 5, 10, 15 y 30 min para sinaptosomas), posteriormente la reacción fue detenida a baja temperatura (4 °C) y por último, se adicionaron 7 mL de líquido de centelleo a base de tolueno para medir las desintegraciones por minuto (DPM) en un contador de centelleo líquido. Como se observa en la figura 27, del

minuto 1 al 10 en gliosomas, la captura de GABA (medida a través de las DPM) incrementó de manera proporcional al tiempo de incubación (fig.27 A), mientras que este incremento en sinaptosomas se registró desde el minuto 1 hasta el 15 (fig. 27 B), después de este período, se observó una asíntota, que indica la posible saturación del sistema; debido a ello, los subsecuentes estudios de captura de GABA se realizaron hasta el minuto 5 para los gliosomas y al minuto 10 en el caso de los sinaptosomas.

Los principales transportadores de GABA en el GPe de primates y ratas, son el GAT-1 y el GAT-3 (Galván y cols., 2010; Jin y cols., 2011 a y b; Jin y cols., 2012), los cuales tienen una localización definida, ya que el GAT-1 se encuentra en neuronas, mientras que el GAT-3 está exclusivamente en células gliales (Galván y cols., 2010). Después de haber mostrado que los sinaptosomas y gliosomas pueden capturar GABA, el siguiente paso fue estudiar si este proceso era mediado por los transportadores antes mencionados, para realizar dicho estudio, se empleó SKF89976A y SNAP5114 - los cuales son bloqueadores del GAT-1 y del GAT-3 respectivamente- y se midió la captura de GABA en sinaptosomas y gliosomas.

La figura 27 C, muestra una disminución de la captura de GABA al utilizar el bloqueador del GAT-3 en gliosomas de GPe ($IC_{50} = 0.156$ nM; tabla 4). Sin embargo, el bloqueador del GAT-1, no produjo cambios sobre la captura de GABA, lo cual indica que el principal transportador de GABA en astrocitos, es el GAT-3. Por otro lado, el bloqueo del GAT-1 en sinaptosomas de GPe de ratas, disminuyó la captura de GABA, de manera concentración dependiente ($IC_{50} = 6.15$ nM), mientras que el bloqueador GAT-3, no produjo modificaciones en la captura de GABA de los sinaptosomas (fig. 27 D y tabla 4), por tanto, se asume que el GAT-1 es el que modula la captura de GABA neuronal.

Una de las características más importantes de los transportadores de GABA es su dependencia al Na^+ y Cl^- (Borden, 1996). Para demostrar que la captura de GABA es regulada por este tipo de proteínas, se midió la captura de GABA en sinaptosomas y gliosomas de GPe de ratas intactas, después de disminuir la temperatura y omitir el Na^+ de las soluciones de trabajo. La figura 27 E muestra los efectos producidos en los gliosomas de GPe, donde se registró que la temperatura a

4 °C, disminuyó significativamente la captura de GABA en un 70 %, mientras que el cambio de NaCl por cloruro de colina, disminuyó la captura de GABA en un 66 %. Por último, nuevamente se muestra que el SKF89976A [10 µM] no disminuyó la captura de GABA, mientras que el SNAP5114 [10 µM], disminuyó este evento en un 44 %, lo cual confirma y sustenta los resultados, que indican que el GAT-3 se localiza en gliosomas de GPe y que este transportador regula la captura de GABA astrocítica.

El estudio de la captura de GABA en los sinaptosomas de GPe, se muestra en la figura 27 F. La captura de GABA disminuyó en un 75 % al disminuir la temperatura a 4 °C, mientras que la omisión de Na⁺ en la solución fisiológica, disminuyó la captura de GABA en un 65 %. Finalmente, la captura de GABA disminuyó en un 75 % al bloquear al GAT-1 (SKF89976A, 10 µM), mientras que el bloqueo del GAT-3 no produjo cambios en la captura de GABA. Lo cual indica que el GAT-1 es el transportador encargado de regular la captura de GABA de tipo neuronal. La tabla 5 muestra los porcentajes que indican los cambios en la captura de GABA tanto en gliosomas como en sinaptosomas.

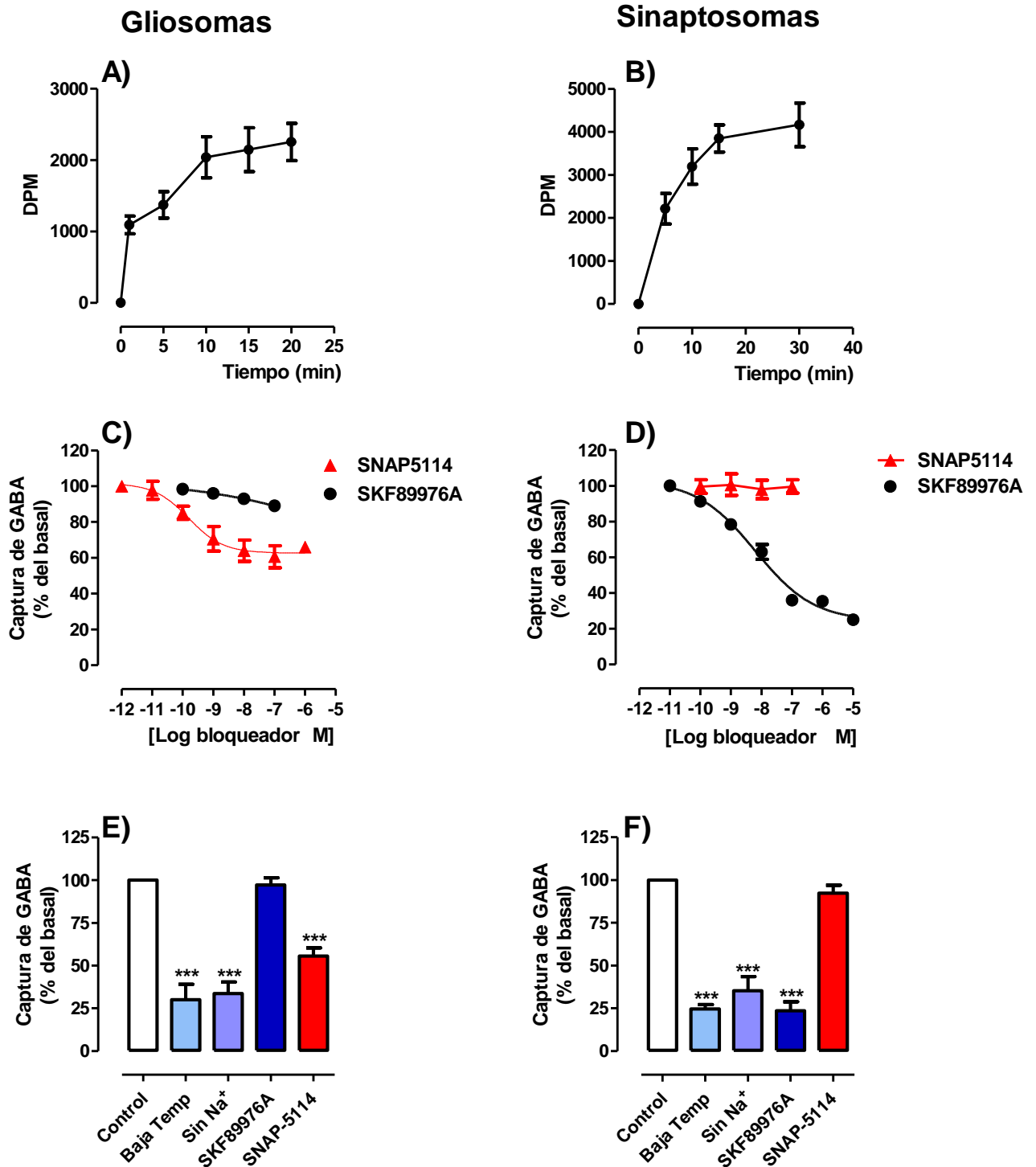


Fig. 27. Captura de GABA en gliosomas y sinaptosomas de globo pálido externo de ratas intactas. A) La captura de GABA en gliosomas es lineal hasta el minuto 10; B) la captura en sinaptosomas es lineal hasta el minuto 15; C) el GAT-3 regula la captura de GABA en gliosomas; D) en sinaptosomas, el GAT-1 regula la captura de GABA. E y F) GAT-3 y GAT-1 son dependientes de temperatura fisiológica y de Na⁺. Los valores son el promedio + ESM determinado en 3 experimentos con 4 réplicas cada uno (ANOVA de una vía y post-test comparación múltiple de Dunnett, ***p<0.001).

Tabla 4 Captura de GABA después del bloqueo del GAT-1 y GAT-3 en sinaptosomas y gliosomas de GPe.

Fármaco	IC ₅₀ (nM)	
	Gliosomas GPe	Sinaptosomas GPe
SNAP5114	0.156	463500
SKF89976A	ND	6.15

Tabla 5 Captura de GABA después de modificaciones fisiológicas y farmacológicas en gliosomas y sinaptosomas de GPe de ratas intactas.

Condición	Captura de GABA (% del basal)	
	Gliosomas	Sinaptosomas
Control	100	100
Baja temperatura (4°C)	30 ± 9.02	25 ± 2.60
Sin [Na ⁺]	34 ± 6.70	35 ± 8.19
SKF89976A [10 µM]	97 ± 4.09	24 ± 5.23
SNAP5114 [10 µM]	56 ± 4.84	92 ± 4.66

9.3 Efecto de la activación de los receptores CB1 y GPR55, sobre la captura de GABA en el globo pálido externo de ratas intactas.

Se ha demostrado ampliamente que el ARNm para el receptor CB1, se localiza en el estriado de ratas (Romero y cols., 2000) y que el receptor se expresa en las terminales estriado-palidales (Herkenham y cols., 1990). También, se ha demostrado que el ARNm para el receptor GPR55 se expresa en el estriado de rata, sin embargo, no se tienen reportes que indiquen la expresión del receptor en el GPe.

Uno de los aspectos más importantes en este trabajo, fue mostrar la expresión de estos dos receptores a cannabinoides en el GPe; para ello, se obtuvo proteína de

sinaptosomas y gliosomas de GPe de ratas intactas y posteriormente, se realizó la técnica de western blot para evaluar la expresión de los receptores CB1 y GPR55. La figura 28 A y B corresponde al western blot que muestra la presencia de una proteína de 60 kDa y otra de 37 kDa respectivamente, las cuales corresponden a los receptores CB1 y GPR55 en proteína de sinaptosomas y gliosomas de GPe (G y S). Asimismo, se muestra la expresión de la actina (43 kDa) como control de carga y de la GFAP (50 kDa) como marcador de astrocitos aislados. Las densitometrías realizadas en sinaptosomas y gliosomas para cada receptor se visualizan en las figuras 28 C y D, las cuales se obtuvieron por la normalización con la actina. Este resultado corrobora la expresión de ambos receptores en el GPe y permite su estudio sobre la captura de GABA.

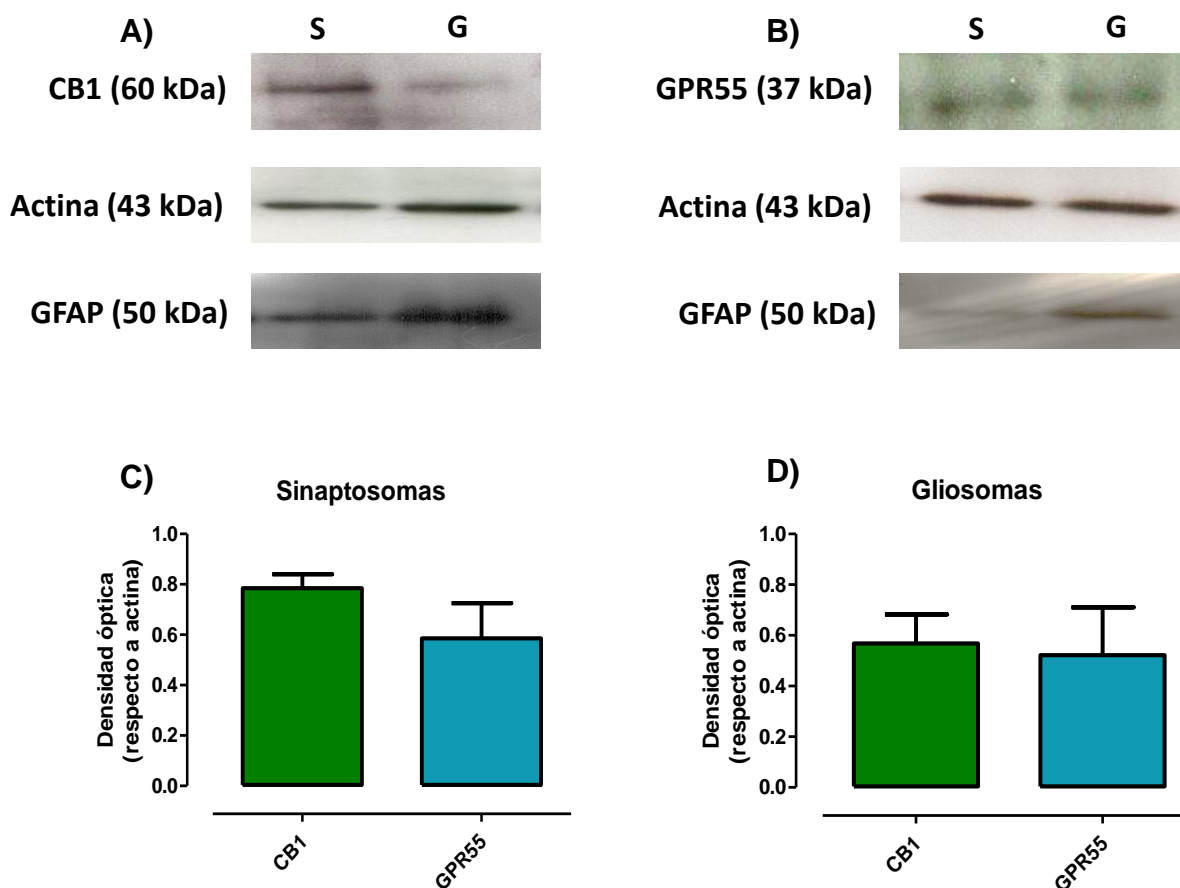


Fig. 28. Expresión de los receptores CB1 y GPR55 en el globo pálido externo de ratas. A) Se muestra el western blot para el receptor CB1 y sus respectivos controles (actina y GFAP); B) western blot para el receptor GPR55 y sus respectivos controles (actina y GFAP), en 50 μ g de proteína de sinaptosomas (S) y gliosomas (G). En C y D) se muestra las densitometrías para el receptor CB1 y GPR55 en S y G (n= 3).

La figura 26 indica que la activación de los receptores CB1 disminuye la captura de GABA en el GPe, no obstante, no se sabe si esta disminución en la captura se debe al bloqueo del GAT-1 o del GAT-3. Para contestar esta pregunta, se midió la captura de GABA con los agonistas y antagonistas de dicho receptor en sinaptosomas y gliosomas de GPe de ratas intactas.

La figura 29 A, muestra los datos obtenidos durante los estudios de captura de GABA después de activar o inactivar a los receptores CB1 en los sinaptosomas de GPe. Se realizaron curvas concentración-respuesta con dos agonistas CB1 (ACEA y WIN55212-2; 0.1, 1, 10, 100 nM, 1, 10 y 100 μ M), sin embargo, ningún agonista

empleado inhibió la captura de GABA. No obstante, de manera interesante se encontró que el antagonista del receptor CB1 (AM251), disminuyó la captura de GABA de manera concentración dependiente ($IC_{50}= 0.93 \mu\text{M}$). Existen reportes que indican que el AM251, puede ser agonista del receptor GPR55 (Ryberg y cols., 2007; Kapur y cols., 2009). Debido a los resultados obtenidos, en este trabajo se propone que los receptores GPR55 pueden modular la captura de GABA en los sinaptosomas de GPe de ratas. Para verificar esta posibilidad, se realizó una curva concentración respuesta con lisofosfatidilinositol (LPI), que es el agonista endógeno de los receptores GPR55, lo cual produjo una disminución concentración-dependiente de la captura de GABA ($IC_{50}= 0.65 \mu\text{M}$) (fig. 29 A).

Debido a que la activación de los receptores CB1 en sinaptosomas de GPe no disminuyó la captura de GABA a pesar de haber ya demostrado que su activación disminuía la captura de GABA de manera importante en el GPe, se propuso que el receptor CB1 que está en los astrocitos (ver fig. 28 A), pudiera inhibir este proceso mediado por el GAT-3. Para mostrar si este evento era posible, se midió la captura de GABA en gliosomas de GPe a concentraciones crecientes (0.1, 1, 10, 100 nM y 1 μM) de ACEA. Los resultados obtenidos mostraron una disminución de la captura de GABA de manera concentración dependiente al agonista del receptor CB1 y una $IC_{50}= 5.07 \text{ nM}$; de la misma forma, la activación de este receptor con WIN55212-2 también disminuyó la captura de GABA ($IC_{50}= 31.62 \text{ nM}$) (fig. 29 B), no obstante, la activación de los receptores GPR55 con LPI, no produjo ningún cambio en la captura de GABA. Las IC_{50} obtenidas en las diferentes curvas concentración respuesta se concentran en la tabla 6.

Por otro lado, la figura 29 C muestra que la activación de los receptores CB1 (ACEA [1 μM]) no disminuyó la captura de GABA, mientras que la activación de los receptores GPR55 con AM251 [10 μM] y LPI [10 μM] (agonistas del GPR55), disminuyó la captura de GABA en un 47 % y 33 % respectivamente y que la co-administración de ACEA y AM251, produjo una disminución de la captura de un 43 %, lo cual permite proponer que los receptores GPR55 del GPe de ratas participan en la inhibición de la captura de GABA.

Finalmente, la figura 29 D muestra que la activación de los receptores CB1 [1 μ M], disminuye la captura de GABA en un 39 %, mientras que la administración de AM251 [10 μ M] y LPI [10 μ M] no produjo cambios y que la co-administración de ACEA y AM251, no permitió la activación del receptor CB1. En la tabla 7, se encuentran los porcentajes de la captura de GABA obtenidos con respecto a la muestra basal.

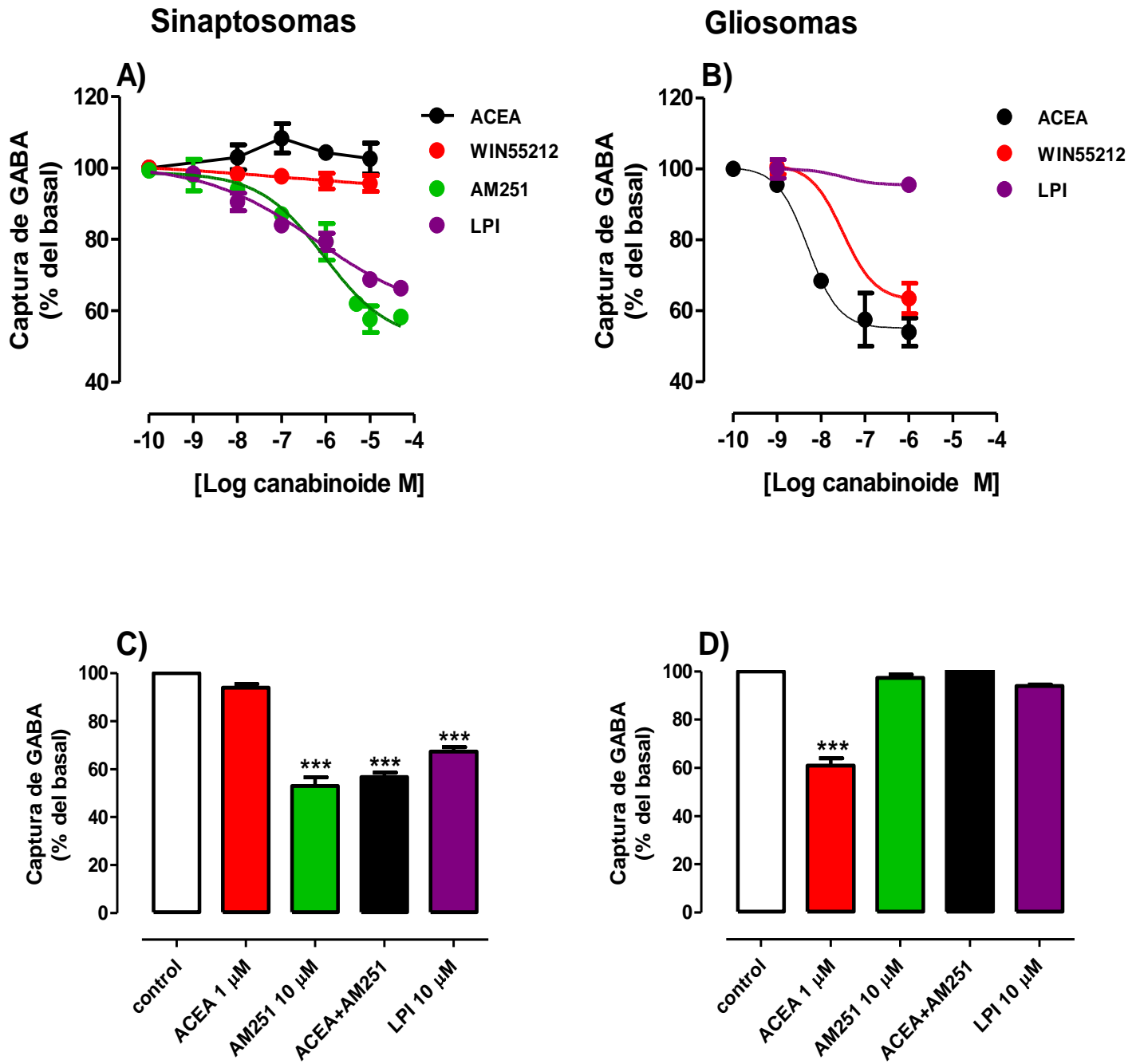


Fig. 29. Efecto de la activación de los receptores CB1 y GPR55, sobre la captura de GABA en gliosomas y sinaptosomas de globo pálido externo de ratas intactas. La activación de los receptores GPR55 con AM251 y LPI, inhibe la captura de GABA sinaptosomas (A y C), mientras que la activación de los receptores CB1 con ACEA, disminuye la captura en gliosomas (B y D). Los valores son el promedio + ESM determinado en 3 experimentos con 4 réplicas cada uno (ANOVA de una vía y post-test comparación múltiple de Dunnett, *** $p < 0.001$).

Tabla 6 Inhibición de la captura de GABA por agonistas del receptor CB1 y GPR55

Fármaco	IC ₅₀ (nM)	
	Sinaptosomas	Gliosomas
ACEA	ND	5.07
WIN55212-2	ND	31.62
AM251	0.93	
LPI	0.65	

Tabla 7 Captura de GABA mediada por diferentes fármacos en el globo pálido externo

Fármaco	Captura de GABA (% del basal) en GPe	
	Sinaptosomas	Gliosomas
Control	100	100
ACEA [1 µM]	94 ± 1.52	61 ± 3.05
AM251 [10 µM]	53 ± 3.60	97 ± 1.45
ACEA+AM251	57 ± 1.85	100 ± 1.76

9.4 Participación de las vías adenilil ciclasa-PKA y PLC-PKC, sobre la captura de GABA en el globo pálido externo de ratas intactas.

El GAT-1 tiene en su estructura varios sitios de fosforilación para la PKA y PKC según el modelo propuesto por Guastella y cols. (1990), y se ha sugerido que estos sitios pueden modular la función de dicho transportador, sin embargo, no se sabe si estas vías de señalización participan en la inhibición de la captura de GABA mediada por los receptores a cannabinoides CB1 y GPR55. Debido a ello se emplearon activadores y bloqueadores específicos de cada vía para estudiar su posible participación en la modulación de la captura de GABA.

La primera vía de señalización estudiada fue la de Ac-PKA; se activó a la Ac con forskolina (fsk) [10 µM] y a la PKA con 8-Br-AMPC [350 µM] y se midió la captura de GABA en sinaptosomas de GPe de ratas intactas. La figura 30 muestra que la administración del bloqueador del GAT-1, SKF89976A [10 µM], inhibió la captura de GABA en un 62 %, sin embargo, la captura de captura no disminuyó al activar a la Ac

ni a la PKA. El porcentaje de la captura de GABA con respecto a la captura basal obtenida en 3 experimentos, se puede observar en la tabla 8.

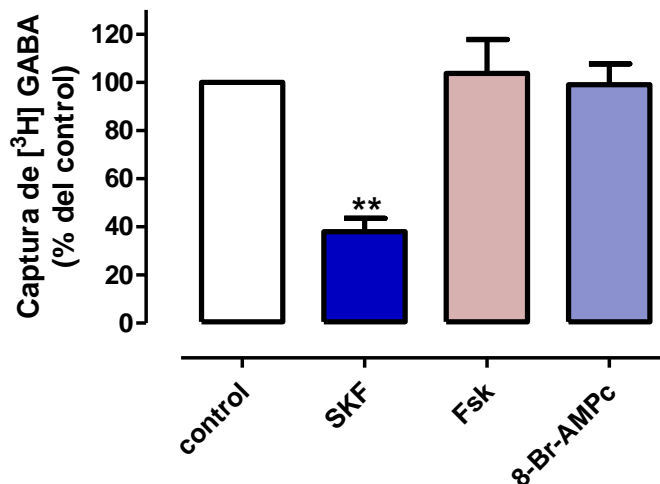


Fig. 30. Efecto de la activación de la adenilil ciclasa y de la PKA, sobre la captura de GABA en sinaptosomas de globo pálido externo de ratas intactas. Los valores son el promedio + ESM determinado en 3 experimentos con 4 réplicas cada uno (ANOVA de una vía y post-test comparación múltiple de Dunnett, ** $p < 0.01$).

Tabla 8 Efecto de la activación de la PKA sobre la captura de GABA en sinaptosomas de GPe

Fármaco	Captura de GABA (% del basal)
Control	100
SKF89976A [10 μ M]	38 \pm 5.50
Forskolina [10 μ M]	104 \pm 14.17
8-Br-AMPC [350 μ M]	99 \pm 8.71

Posteriormente, se activó a la PKC, ya que el GAT-1 tiene tres sitios intracelulares de fosforilación para esta proteína (Ser²⁴, Thr⁴⁶ y Ser⁵⁶²; Guastella y cols., 1990). La captura de GABA disminuyó en un 48 % al activar a los GPR55 con AM251 [10 μ M], mientras que la activación de la PKC con PMA [100 nM] disminuyó la captura en un 20 %. Asimismo, la co-activación de los GPR55 y de la PKC, disminuyó la captura de GABA en un 69 %, es decir, las dos proteínas inhiben la captura de GABA por vías diferentes, lo cual produce un efecto aditivo (fig. 31 A). El

bloqueo de la PKC con Gö6983 [100 nM] confirma que el GPR55 y la PKC utilizan vías diferentes para inhibir la función del GAT-1, pues aunque la acción de la PKC se bloqueó, el agonista del GPR55 (AM251) continuó bloqueando la captura de GABA en un 53 % (fig. 31 B). Los porcentajes de la captura de GABA con respecto al basal, se pueden observar en la tabla 9.

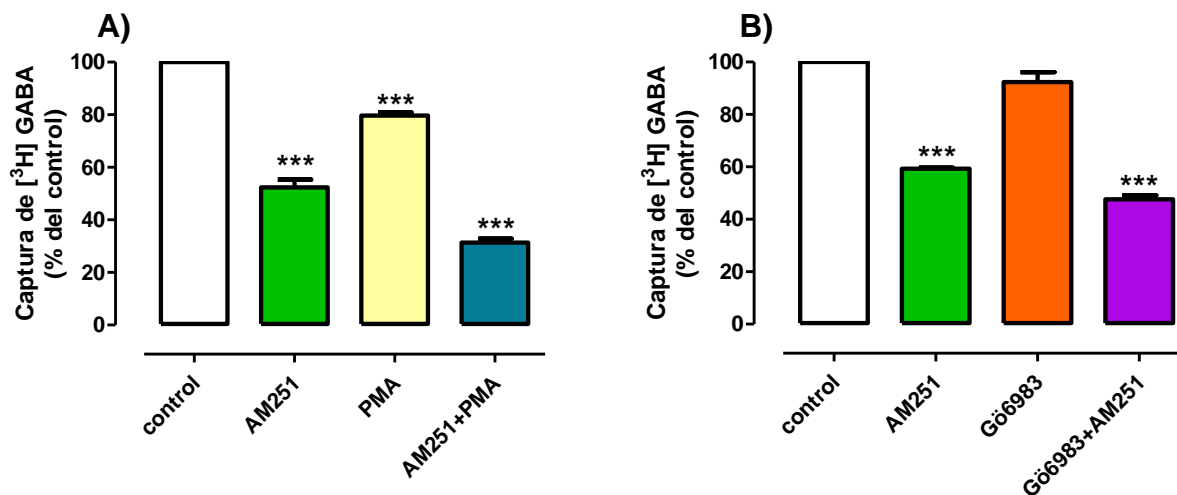


Fig. 31. Papel de la PKC, sobre la captura de GABA en sinaptosomas de globo pálido externo de ratas intactas. A) activación de la PKC; B) bloqueo de la PKC. Los valores son el promedio + ESM determinado en 3 experimentos con 4 réplicas cada uno (ANOVA de una vía y post-test comparación múltiple de Dunnett, ***p<0.001).

Tabla 9 Efecto de la PKC sobre la captura de GABA en sinaptosomas de GPe

Fármaco	Captura de GABA (% del basal)
Control	100
AM251 [10 µM]	52 ± 2.90
PMA [100 nM]	80 ± 1.20
AM251+PMA	31 ± 1.45
Gö6983 [100 nM]	92 ± 3.84
Gö6983 + AM251	47 ± 1.45

9.5 Efecto de la activación de los receptores CB1 y GPR55 sobre la actividad motora de ratas intactas.

Los datos neuroquímicos obtenidos en este trabajo, indican que la activación de los receptores CB1 y GPR55, inhibe la captura de GABA en gliosomas y sinaptosomas de GPe, por tanto, se propone que en un animal íntegro, la activación de estos receptores incrementaría la concentración de GABA en el espacio sináptico, lo cual produciría hipocinesia. Para mostrar este efecto, se evaluó la actividad motora de ratas intactas, después de haber administrado los agonistas de dichos receptores. Asimismo, se evaluó la actividad motora de ratas después de haber administrado los bloqueadores del GAT-1 y del GAT-3.

En primera instancia, se evaluó la actividad motora en el modelo de campo cerrado, donde se registraron los movimientos y desplazamientos de las ratas. Cabe aclarar nuevamente, que los movimientos consisten en acicalaciones o erguidos (interrupción de un haz de luz) realizados por las ratas, mientras que los desplazamientos, son las deambulaciones que los sujetos realizan de un lado a otro de la caja (interrupción de 4 haces de luz).

La figura 32 A muestra las cuentas acumuladas durante los sesenta min de la evaluación de la actividad motora en el campo cerrado. Se puede observar que el número de cuentas realizadas por las ratas, incrementó con respecto al tiempo, sin embargo, este movimiento fue menor cuando se activó a los receptores CB1 y a los GPR55. De la misma forma, se observa que el bloqueo específico de los GAT-1 y 3, también disminuye de manera considerable la actividad motora de las ratas.

De manera más específica, se registró el número de movimientos (fig. 32 B). Las ratas administradas intrapalidalmente con el vehículo (DMSO), registraron en promedio 3176 movimientos, mientras que las ratas administradas con el agonista GPR55 (LPI [10 μ M]), disminuyeron sus movimientos en un 44 %, al registrar en promedio 1792 movimientos. La activación de los receptores CB1 palidales con ACEA [500 nM], disminuyó los movimientos de las ratas en un 40 % (1929 movimientos). Los bloqueadores del GAT-1 y del bloqueador del GAT-3, a una concentración de [10 μ M], disminuyeron significativamente los movimientos de los

sujetos de experimentación en un 53 % y en un 54 %, al registrar 1497 y 1468 movimientos respectivamente (fig. 32 B).

Los resultados neuroquímicos obtenidos en este estudio, indican que el GAT-1 se localiza en terminales nerviosas, mientras que el GAT-3 está en astrocitos; debido a esto, se propone que los receptores GPR55 inhiben la actividad del GAT-1 y que los receptores CB1 inhiben al GAT-3. Por esta razón, se realizó la co-administración de LPI/SKF89976A y de ACEA/SNAP5114, donde ambos grupos de animales, disminuyeron sus movimientos en un 32 % y en un 60 % (2169 y 1274 movimientos) respectivamente. Por último, la co-activación de los receptores CB1 y GPR55, disminuyó el movimiento de los animales en un 51 % (1559 movimientos) (tabla 10).

De la misma forma en que se registró una disminución en los movimientos de las ratas, también hubo una disminución en cuanto a los desplazamientos de las mismas (tabla 11). En la figura 32 C se observa que las ratas donde fueron activados los GPR55, disminuyeron su deambulación al registrar 236 desplazamientos, mientras que el grupo administrado con el vehículo registró 457 desplazamientos (disminución del 48 %). En el mismo sentido, las ratas administradas con ACEA, realizaron 192 desplazamientos (disminución del 58 % con respecto al vehículo). De la misma manera, el bloqueo del GAT-1 y del GAT-3, disminuyó los desplazamientos de los animales en un 60 y 58 % respectivamente (181 y 192 desplazamientos respectivamente); la co-administración del agonista CB1 y del bloqueador del GAT-3, disminuyó los desplazamientos en un 58 % (191 desplazamientos), mientras que la disminución motora al co-administrar el agonista de los receptores GPR55 y el bloqueador del GAT-1, fue de un 51 % (225 desplazamientos). Finalmente, la co-activación de los CB1 y GPR55, produjo una disminución de desplazamientos del 50 % (228 desplazamientos) en los sujetos de experimentación (fig. 32 C).

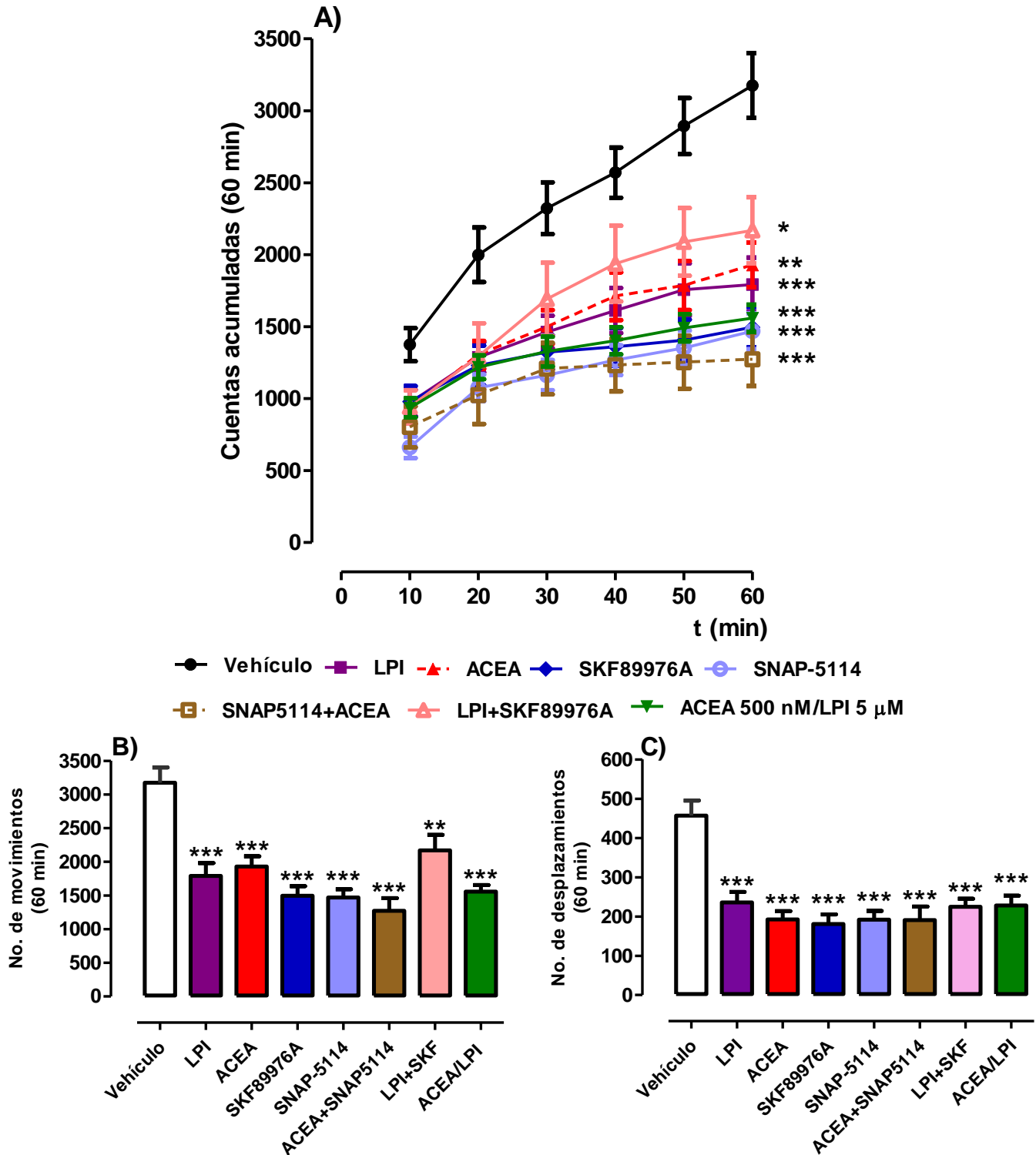


Fig. 32. Actividad motora en campo cerrado. A) Cuentas acumuladas durante una hora; B) movimientos totales; C) número de desplazamientos. Se graficó el promedio de cada parámetro + ESM, B y C, ANOVA de una vía con un post-test de comparación múltiple de Dunnett, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). $n = 12$ ratas por grupo. Vehículo: DMSO 0.001 %; LPI: agonista GPR55; ACEA: agonista CB1; SKF89976A: bloqueador GAT-1; SNAP5114: bloqueador GAT-3.

Tabla 10 Movimientos en el modelo de campo cerrado después de la administración intrapalidal de agonistas CB1 y GPR55

Grupo	Movimientos registrados	Movimientos (% del vehículo)
Vehículo	3176 ± 225.00	100
LPI	1792 ± 188.00	56
ACEA	1929 ± 155.00	60
SKF89976A	1497 ± 141.00	47
SNAP5114	1468 ± 125.00	46
ACEA + SNAP5114	1274 ± 186.00	40
LPI + SKF89976A	2169 ± 230.00	68
ACEA + LPI	1559 ± 94.00	49

Tabla 11 Desplazamientos en el modelo de campo cerrado después de la administración intrapalidal de agonistas CB1 y GPR55

Grupo	Desplazamientos registrados	Desplazamientos (% del vehículo)
Vehículo	457 ± 38.00	100
LPI	236 ± 27.00	52
ACEA	192 ± 22.00	42
SKF89976A	181 ± 24.00	40
SNAP5114	192 ± 22.00	42
ACEA + SNAP5114	191 ± 34.00	42
LPI + SKF89976A	225 ± 21.00	49
ACEA + LPI	228 ± 25.00	50

Un día después de la evaluación en el campo cerrado, la actividad motora fue nuevamente evaluada, esta vez en el campo abierto, donde se registró el número de cuadros visitados, el número de erguidos y el número de torsiones (fig. 33).

Las ratas administradas intrapalidalmente con vehículo, visitaron en promedio 82 cuadros durante los quince minutos de duración de la prueba (100 %). Por otro lado, la activación de los receptores GPR55 y CB1 disminuyeron el número de cuadros visitados a 38 y 35 respectivamente (disminución del 54 y 57 %), mientras que el bloqueo del GAT-1 y 3 también produjo un evento inhibitorio, pues las ratas de ambos grupos solamente visitaron 46 y 29 cuadros respectivamente (disminución del 44 y 65 %). La coadministración del agonista CB1 y del bloqueador GAT-3, así como del agonista GPR55 y del bloqueador GAT-1, disminuyó los cuadros visitados en esta prueba a 44 y 61 respectivamente (disminución del 46 y 26 %). Por último, las ratas donde se realizó la coactivación de los receptores CB1 y GPR55 visitaron 44 cuadros (disminución del 46 %) (fig. 33 A y Tabla 12).

En el campo abierto, también se registró una disminución en el número de erguidos. Las ratas administradas con vehículo realizaron en promedio 31 erguidos, mientras que las ratas administradas con LPI o con ACEA, realizaron 16 y 14 erguidos respectivamente, lo que indica una disminución del 48 y 55 %. Por otro lado, el bloqueo de los GAT-1 y 3, disminuyó los erguidos a 13 y 10 respectivamente (disminución del 58 y 68 %). Al activar a los receptores CB1 y bloquear al GAT-3 en el GPe de las ratas, estas realizaron 15 erguidos (disminución del 52 %) mientras que las ratas con la activación del GPR55 y el bloqueo del GAT-1 realizaron 21 erguidos, lo cual corresponde a una disminución del 33 % con respecto al control. Finalmente la coactivación de los receptores CB1 y GPR55 en el GPe, produjo la disminución de los erguidos a 16 (disminución del 48 %) (Tabla 13 y fig. 33 B)

El número de torsiones, es el parámetro que indica el grado de asimetría motora de los sujetos de experimentación. El grupo de ratas administradas con vehículo, no realizaron torsiones, mientras que la activación de los receptores GPR55 y CB1, produjo 4 y 8 torsiones, lo cual corresponde a un incremento del 601 y del 1303 % con respecto al grupo vehículo. El bloqueo del GAT-1 y 3 también incrementó la asimetría motora en un 601 y 426 % respectivamente (4 y 3 torsiones

respectivamente). Las ratas administradas con el agonista CB1 y con el bloqueador del GAT-3, realizaron 4 torsiones (incremento del 601 %), mientras que el grupo administrado con el agonista GPR55 y con el bloqueador GAT-1, realizó 6 torsiones (incremento del 952 %). Por último, la coactivación del receptor CB1 y GPR55 produjo 7 torsiones en el grupo de ratas, lo cual corresponde a un incremento del 1128 % con respecto al grupo vehículo (fig. 33 C y Tabla 14).

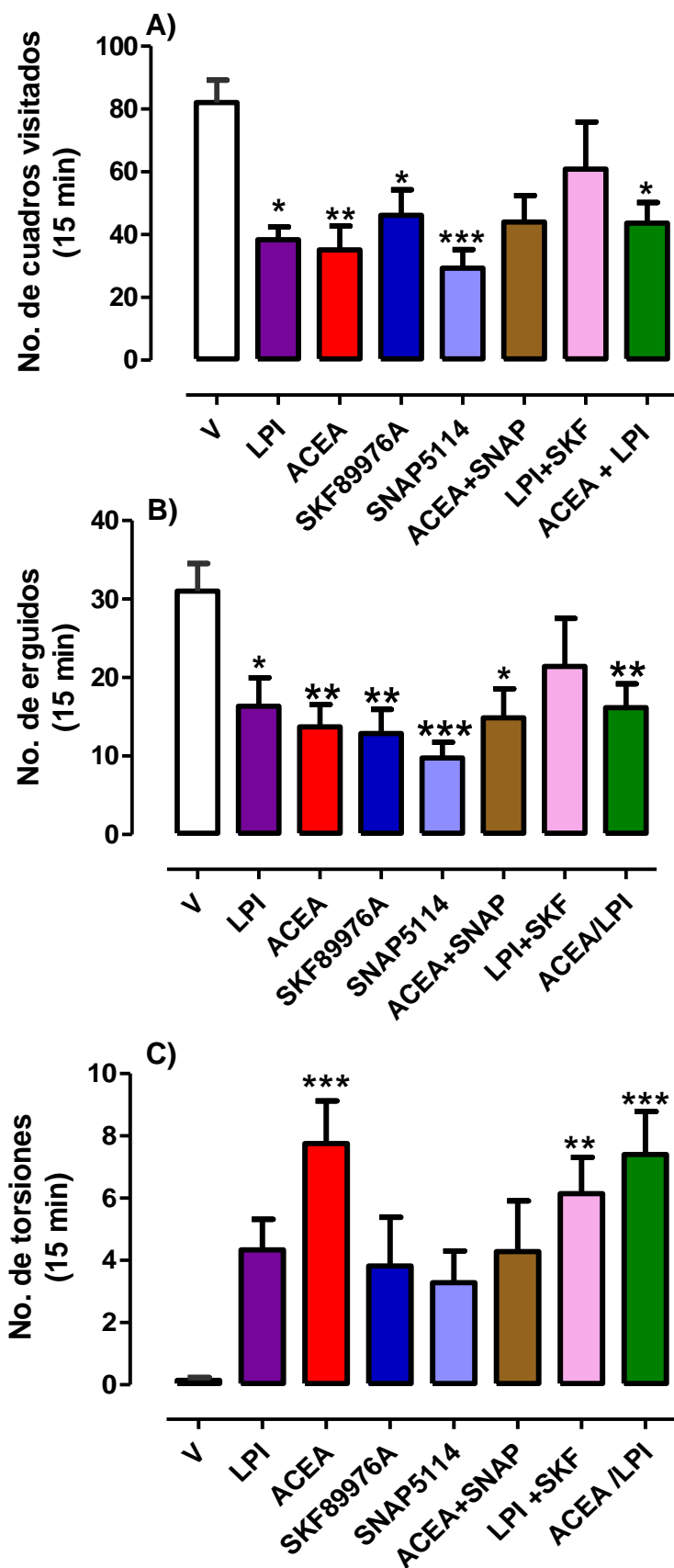


Fig. 33. Actividad motora en campo abierto. A) Cuadros visitados; B) número de erguidos; C) número de torsiones. Se graficó el promedio de cada parámetro + ESM. ANOVA de una vía con un post-test de comparación múltiple de Dunnet, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). $n = 12$ ratas por grupo. Vehículo: DMSO 0.001 %; LPI: agonista GPR55; ACEA: agonista CB1; SKF89976A: bloqueador GAT-1; SNAP5114: bloqueador GAT-3.

Tabla 12 Cuadros visitados en el campo abierto después de la administración intrapalidal de agonistas CB1 y GPR55

Grupo	Cuadros visitados	Disminución en el número de cuadros visitados (% del vehículo)
Vehículo	82 ± 7.00	100
LPI	38 ± 4.00	54
ACEA	35 ± 8.00	57
SKF89976A	46 ± 8.00	44
SNAP5114	29 ± 6.00	65
ACEA + SNAP5114	44 ± 8.00	46
LPI + SKF89976A	61 ± 15.00	26
ACEA + LPI	44 ± 7.00	46

Tabla 13 Número de erguidos en el campo abierto después de la administración intrapalidal de agonistas CB1 y GPR55

Grupo	Número de erguidos	Disminución de erguidos (% del vehículo)
Vehículo	31 ± 4.00	100
LPI	16 ± 9.00	48
ACEA	14 ± 3.00	55
SKF89976A	13 ± 3.00	58
SNAP5114	10 ± 2.00	68
ACEA+SNAP5114	15 ± 4.00	52
LPI+SKF89976A	21 ± 6.00	33
ACEA+LPI	16 ± 3.00	48

Tabla 14 Número de torsiones en el campo abierto después de la administración intrapalidal de agonistas y antagonistas CB1 y GPR55

Grupo	Número de torsiones	Incremento de la asimetría motora (torsiones % del vehículo)
Vehículo	0	
LPI	4 ± 1	601
ACEA	8 ± 1	1303
SKF89976A	4 ± 2	601
SNAP5114	3 ± 1	426
ACEA+SNAP5114	4 ± 2	601
LPI+SKF89976A	6 ± 1	952
ACEA+LPI	7 ± 1	1128

10 DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio, han mostrado que la activación de los receptores CB1 y GPR55, con ACEA y LPI respectivamente, inhiben la captura de GABA en el GPe, en la denominada “sinapsis tripartita”, cuyos componentes son la terminal presináptica, la terminal postsináptica y los astrocitos (Navarrete y Araque 2008). Por un lado, la activación de los receptores GPR55 en sinaptosomas de GPe disminuyó la captura de GABA, a través del bloqueo del GAT-1. Por otro lado, la activación de los receptores CB1 en gliosomas de GPe, inhibió la actividad del GAT-3. Asimismo, se estudiaron las posibles vías de señalización que se encuentran involucradas en la regulación de los receptores CB1 y GPR55 sobre los transportadores de GABA.

Los datos obtenidos, muestran que la inhibición de los transportadores de GABA presentes en el GPe, disminuye la actividad motora de ratas intactas, por lo cual, estas proteínas no solo tienen como función la regulación de la concentración de GABA en el espacio sináptico -lo cual hasta ahora tiene una aplicación importante como terapia anticonvulsivante (Sharopov y cols., 2014)- sino que participan de manera importante en el control motor, lo cual apunta a que estas proteínas pueden ser un blanco terapéutico en el tratamiento de algunas enfermedades de los GB. Asimismo, el presente trabajo muestra la importancia que tienen los astrocitos en la modulación de la neurotransmisión, al modular la captura de GABA en el GPe, siendo estos eventos, modulados por la activación de los receptores a cannabinoides CB1 y GPR55, lo cual contribuye al estudio de la sinapsis tripartita del GPe de rata e incrementa el interés hacia el estudio de este sistema, sobre la regulación de los GB.

Efecto de la activación de los receptores CB1 sobre la captura de GABA en el globo pálido externo

Los receptores CB1 son receptores acoplados a $PG_{i/o}$, por lo cual, su activación conllevará a la disminución de la actividad de la Ac y por tanto a una disminución en la concentración de AMPc (Jarrahian y cols., 2004), lo cual es un mecanismo involucrado en la disminución de la liberación de GABA (Köfalvi y cols.,

2005, Gonzalez y cols., 2009). No obstante, en años anteriores se demostró que la activación de los receptores CB1 también disminuía la captura de GABA en el GPe (Maneuf y cols., 1996), sin embargo, existía la controversia acerca de este nuevo tipo de modulación debido a los resultados contrarios encontrados por otros grupos de trabajo (Romero y cols., 1997; Venderova y cols., 2005). Debido a estas diferencias, en este trabajo se propuso el estudio de los receptores CB1 en rebanadas de GPe de ratas intactas, donde se demostró que la activación de dichos receptores, disminuye de manera concentración-dependiente la captura de GABA (figura 26). Dichos resultados permiten proponer que los receptores CB1 regulan de cierta manera a los GATs 1 y 3 presentes en el GPe, sin embargo, no se sabía si regulaba a los dos de la misma forma o si tendría cierta especificidad con alguno de dichos transportadores.

Naturaleza de los transportadores de GABA en el globo pálido externo de ratas intactas

El principal mecanismo que regula la actividad de un neurotransmisor, es la captura del mismo hacia el espacio intracelular para su posterior degradación o reciclaje y así liberarse nuevamente hacia el espacio sináptico. Estos eventos, en la neurotransmisión GABAérgica, son mediados por los GATs, los cuales se definen como proteínas de doce dominios transmembranales, cuyos extremos N y C terminales son intracelulares y pertenecen a la familia de proteínas dependientes de Na^+ y Cl^- (Borden, 1996). El funcionamiento de dichas proteínas comienza cuando en el espacio sináptico, dos moléculas de Na^+ y una de Cl^- , se unen a los GATs, lo cual produce cambios conformacionales en dicha proteína y permite la unión de una molécula de GABA; al encontrarse unidas las tres moléculas, los GATs se traslocan hacia el espacio intracelular, para liberar al GABA y a los iones implicados para después regresar a su estado basal en espera de nuevas moléculas para transportar (Kanner, 1994).

Debido a que diversos estudios han mostrado que los GATs- 1 y 3 se localizan en las neuronas y astrocitos respectivamente del GPe (Galván y cols., 2005; Galván y cols., 2010; Jin y cols., 2011b; Jin y cols., 2012), en este trabajo se obtuvieron

sinaptosomas y gliosomas de GPe con la finalidad de estudiar la función de cada una de estas proteínas. Cabe señalar que los sinaptosomas, se forman por la capa de fosfolípidos de la membrana celular, y en su interior contienen pequeñas vesículas sinápticas, lo cual indica su origen presináptico, además de los componentes necesarios para el almacenamiento, liberación y captura de diferentes neurotransmisores; asimismo, contienen mitocondrias que permiten la producción de ATP y por tanto un metabolismo activo. Es por ello que se consideran estructuras viables para el estudio de procesos a largo plazo como la liberación y la captura de neurotransmisores (Breuckel y cols., 1997). De la misma forma, los gliosomas se definen como estructuras gliales subcelulares que se caracterizan por contener a la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP), la cual co-existe con proteínas propias de la maquinaria exocítica, además de una cantidad importante de vesículas. La comunidad científica, ha mostrado gran interés acerca de estas estructuras, debido a que los cultivos de astrocitos, son elaborados a partir de ratas neonatas, los cuales han brindado resultados diferentes a lo que ocurre en un cerebro adulto (Milanese y cols., 2009)

La figura 27 A y B, muestra los resultados obtenidos en la cuantificación de la captura de GABA en sinaptosomas y en gliosomas de GPe de ratas intactas, donde se observa que ambas estructuras son capaces de capturar GABA de manera directamente proporcional al tiempo de incubación con la marca radiactiva, además de que este mecanismo es saturable en ambas fracciones celulares, lo cual implica la presencia de una proteína transportadora de GABA.

Una vez que se mostró que tanto sinaptosomas como gliosomas, son fracciones que cuentan con una maquinaria de transporte, se procedió a estudiar la naturaleza del mecanismo de captura en cada estructura, para lo cual se realizó un estudio concentración-respuesta con SKF89976A y SNAP5114, los cuales son bloqueadores específicos del GAT-1 y del GAT-3 con una IC_{50} de 0.64 y 0.8 μ M respectivamente (Borden y cols., 1994; Borden y cols., 1996).

El bloqueo del GAT-1 con SKF89976A, disminuyó la captura de GABA en sinaptosomas con una IC_{50} de 6.15 nM, mientras que el bloqueo del GAT-3 con SNAP5114, disminuyó la captura de GABA en los gliosomas de GPe con una IC_{50} de

0.156 nM (fig. 27 C y D). Dichos eventos corroboran lo demostrado por Galván y cols. (2005 y 2010) acerca de la localización específica de los GAT-1 y GAT-3 en neuronas y células gliales del GPe respectivamente. No obstante, es importante notar, que la inhibición en la captura de GABA mediada por el GAT-3 en gliosomas, fue menor en comparación con la inhibición en la captura producida por el bloqueo del GAT-1 en sinaptosomas, lo cual puede ser explicado a través del estudio de Jin y cols. (2012), donde se muestra, que el bloqueo del GAT-3 en el GPe de ratas, no produce efecto alguno sobre las corrientes postsinápticas excitatorias, a menos que primero se realice el bloqueo del GAT-1, con lo cual, es posible observar la disminución de estas corrientes cuando se bloquea al GAT-3. Posiblemente, si se realiza la co-administración de los bloqueadores del GAT-1 y del GAT-3 en gliosomas, se observe una disminución mayor de la captura de GABA. No obstante, Kersanté y cols. (2013) han propuesto que el GAT-3 localizado en astrocitos de hipocampo de rata, regulan la concentración de GABA en eventos de actividad neuronal sostenida, ya que al inducir la liberación excesiva de GABA por la despolarización inducida por alto K^+ y posteriormente administrar el bloqueador de este transportador, se registró un incremento en la concentración de GABA extracelular en experimentos de microdiálisis realizados en ratas en libre movimiento. Por tanto, se propone que la disminución en la captura de GABA producida por el bloqueo del GAT-3 en los gliosomas de GPe de ratas intactas, pudiese ser mayor si se primero se despolariza a la célula y posteriormente se administra el bloqueador del GAT-3.

Para mostrar que los eventos de captura anteriormente observados, son mediados por un transportador de GABA, se omitió el NaCl y se disminuyó la temperatura a 4°C en las soluciones empleadas en los estudios de captura, donde se observó una disminución significativa tanto en gliosomas como en sinaptosomas del GPe, lo cual concuerda con lo reportado por Borden y cols. (1996) y por González y cols. (2006) y se confirma que la captura registrada en sinaptosomas y gliosomas es a través del GAT-1 y del GAT-3 (fig. 27 E y F).

Expresión de los receptores CB1 y GPR55 en el GPe y sus efectos sobre la captura de GABA

Debido a la expresión del ARNm para el receptor CB1 en el estriado (Romero y cols., 2002) y a la importante densidad de estos receptores en el GPe de primates y roedores (Herkenham y cols., 1990; Herkenham y cols., 1991; Lastres-Becker y cols., 2001; Lastres-Becker y cols., 2005), se propone que se localizan en la vía estriado-palidal de los GB. De la misma forma, Ryberg y cols. (2007) demostraron que el ARNm para otro posible receptor a cannabinoides, denominado GPR55, se localiza de manera importante en el estriado de ratón, por lo cual, una pregunta importante en este trabajo fue si dicho receptor se expresaba en el GPe de ratas. Se demostró por medio de western blot en proteína de sinaptosomas de GPe de ratas, que ambos receptores con un peso molecular de 60 (CB1) y de 37 kDa GPR55) respectivamente (fig. 28 A-D) se expresan de manera importante. Sin embargo, la expresión de estos dos receptores, no solo se limita a las terminales nerviosas, sino que también se expresan en astrocitos, ya que de la misma forma que Navarrete y Araque (2008), se mostró la expresión del receptor CB1 y GPR55 en los gliosomas del mismo núcleo, lo cual, permite suponer un importante papel del sistema endocanabinoide en la modulación de la neurotransmisión GABAérgica.

El principal mecanismo donde se ha demostrado la participación de los receptores CB1 en la vía estriado-palidal es la liberación de GABA, pues al ser activados con agonistas cannabinoides endógenos o exógenos, inhiben la liberación al disminuir la actividad de la Ac (González y cols., 2009). Sin embargo, se ha demostrado que la captura de GABA también es una diana importante en la modulación de los receptores CB1 en el GPe (Maneuf y cols., 1996), no obstante, hasta ahora no es claro el mecanismo por el cual estos receptores modulan este evento. Debido a ello, se cuantificó la captura de GABA en sinaptosomas de GPe de ratas intactas después de activar a los receptores CB1, sin embargo, no se registraron cambios significativos con los dos agonistas empleados (ACEA y WIN55212-2; fig. 29 A), lo cual coincide con los datos reportados por Romero y cols. (1998) y por Venderova y cols. (2005), ya que no observaron cambios en la captura de GABA en sinaptosomas y rebanadas de GPe respectivamente. Asimismo, Köfalvi

y cols. (2005) tampoco observaron disminución de la captura en sinaptosomas de estriado de ratas.

A pesar de no encontrar cambios al activar a los receptores CB1, sí se observó una disminución de la captura de GABA de manera inversamente proporcional a la concentración de AM251 (antagonista CB1) (fig. 29 A y C), el cual ha sido reportado como agonista del receptor GPR55 (Kapur y cols., 2009; Anavi-Goffer y cols., 2012); este evento, aunado a la expresión del GPR55 en sinaptosomas de GPe, permitió proponer que estos receptores son los que inhiben la captura de GABA. No obstante, se ha propuesto que el agonista endógeno de los receptores GPR55 es el LPI (Oka y cols., 2007), por lo cual, en este trabajo también se empleó dicho fármaco, donde efectivamente, se observó la disminución de la captura de GABA en los sinaptosomas de GPe (fig. 28 A y C), evento que muestra que la captura de GABA neuronal, es regulada por los receptores GPR55.

En estudios anteriores se ha demostrado que la activación de los receptores CB1 disminuye la captura de GABA (Maneuf y cols., 1996), sin embargo en este estudio no se encontró dicho efecto en los sinaptosomas de GPe, lo cual se puede deber a que en los trabajos anteriores, se ha medido la captura de GABA en rebanadas de GPe, mientras que en el presente estudio, solo se han aislado las terminales nerviosas de dicho núcleo. Debido a que anteriormente se ha demostrado la expresión de los receptores CB1 en astrocitos del estriado de ratas (Rodríguez y cols., 2001) y en este trabajo se mostró que también se expresan en astrocitos de GPe, se propone que los receptores CB1 que se expresan en astrocitos, son los responsables de inhibir la captura de GABA,

Shivachar (2007), demostró que la activación de los receptores CB1 en cultivos de astrocitos corticales de ratas, disminuye la captura de D-aspartato de manera concentración-dependiente. Asimismo, Bari y cols. (2011), mostraron que la activación de los receptores CB1 en gliosomas de la corteza de ratas, participa de manera importante en la inhibición de la liberación de glutamato, además de que esta fracción subcelular cuenta con toda la familia endocanabinoide. Debido a lo mencionado anteriormente, es viable proponer que los receptores CB1 de los astrocitos del GPe de rata son los que inhiben la captura de GABA. Para demostrar

esta suposición, se cuantificó la captura de GABA en gliosomas de GPe de ratas intactas, en donde se observó la disminución de la captura de GABA a medida que la concentración de agonista CB1 (ACEA y WIN55212-2) incrementaba (fig. 29 B y D). Los resultados obtenidos en este estudio, indican la importancia del sistema endocanabinoide en la modulación de lo que ahora se conoce como la sinapsis tripartita propuesta por varios grupos de trabajo, en donde se propone la activa participación de los astrocitos en la modulación de la señal química que ocurre en las terminales sinápticas (Stella, 2004; Navarrete y Araque, 2008; Stella, 2010).

Debido a que los receptores CB1 y GPR55 inhiben la captura de GABA en sitios distintos de la sinapsis tripartita, se propone que los receptores GPR55 inhiben la función del GAT-1 neuronal, mientras que los receptores CB1 inhiben al GAT-3 de los astrocitos. No obstante, aún no se tiene claro el mecanismo por el cual estos receptores inhiben a dichas proteínas transportadoras. Guastella y cols. (1990), mostraron que el GAT-1, tiene varios sitios de fosforilación, entre los que se encuentra uno para la PKA y siete para la PKC, por lo cual, se decidió estudiar el efecto de la activación de ambas proteínas cinasas sobre la captura de GABA en los sinaptosomas del GPe. Es importante el estudio de la captura, debido a que este proceso es el principal regulador de la concentración de GABA en el espacio sináptico, por lo tanto, el conocimiento de la función de los transportadores de GABA, permitirá conocer más sobre dicha regulación y las posibles implicaciones que conllevará dicha función.

Participación de las vías Ac-PKA y PLC-PKC sobre la captura de GABA modulada por los receptores GPR55

González y cols. (2006), mostraron que la activación de la Ac y de la PKA en rebanadas de GPe de ratas, disminuye la captura de GABA de manera importante, sin embargo, en sinaptosomas de hipocampo de ratas se demostró que la activación de estas mismas proteínas, incrementa la captura de GABA (Cristóvão-Ferreira y cols., 2009); no obstante, en este estudio no se observaron cambios al activar a ambas proteínas, hecho que concuerda con la propuesta realizada en este trabajo, acerca de la actividad del GPR55, ya que este receptor se acopla a una $PG_{12/13}$ y

también a $PG_{q/11}$, cuya señalización no involucra la activación de la vía Ac-PKA (fig. 30).

El hecho de proponer que la PKC inhibe la actividad del GAT-1, se basa en que dicho transportador tiene en su estructura siete posibles sitios de fosforilación para dicha proteína, de los cuales, tres se localizan intracelularmente en Ser²⁴, Thr⁴⁶ y Ser⁵⁶² (Guastella y cols., 1990). Asimismo, diversos grupos de trabajo han mostrado que la activación y/o el bloqueo de la PKC, puede modular la actividad del GAT-1 (Bahena-Trujillo y Arias Montaña, 1999; Quick y cols., 2004). Debido a que el receptor GPR55 puede acoplarse a una $PG_{q/11}$, se propuso que su activación conllevaría a la activación de la PKC, siendo esta proteína la que interactúe con el GAT-1, trayendo como resultado la inhibición en la captura de GABA registrada en las pruebas neuroquímicas presentadas en este trabajo. No obstante, los datos obtenidos, muestran una disminución significativa de la captura de GABA cuando la PKC fue activada, sin embargo, la co-activación de los receptores GPR55 y de la PKC, produjo un evento aditivo sobre la inhibición de la captura de GABA (fig. 31), lo cual indica que ambas proteínas, inhiben al GAT-1 por vías de señalización que no se encuentran relacionadas. Este hecho se confirmó cuando se realizó el bloqueo de la PKC más la activación del GPR55, en donde se mantuvo la inhibición de la captura de GABA a pesar del bloqueo de la PKC.

Debido a los resultados obtenidos, se propone que la PKC no forma parte de la señalización desencadenada por los receptores GPR55 sobre el GAT-1. Por lo cual, se propone que la unión del agonista (LPI o AM251) al GPR55, permite la activación de la subunidad $\alpha_{q/11}$ (Lauckner y cols., 2008), lo cual permitirá el incremento de la síntesis del IP_3 que a su vez incrementará la liberación de Ca^{2+} intracelular, lo cual podría participar en la activación de la sintasa de óxido nítrico neuronal (nNOS) y por tanto incrementar la síntesis de óxido nítrico que promueve la unión de SNAP-25 a la syntaxina 1, la cual se une directamente al extremo N-terminal del GAT-1 y modula su función (Deken y cols., 2000). La formación del complejo SNARE es imprescindible para que se realice la liberación de neurotransmisores, sin embargo, estudios recientes de Fan y cols. (2006) han mostrado que este complejo

inhibe la función del GAT-1, por tanto, se propone que el GPR55 pudiera activar la formación del complejo SNARE y así inhibir la captura de GABA.

Por otro lado, diversos estudios han mostrado que el GPR55 puede acoplarse a $PG\alpha_{12/13}$ la cual tiene como función la activación de la PG pequeña RhoA, la cual a su vez activa a rock cuya función es la movilización y restructuración de los polímeros de actina (Ryberg y cols., 2007; Anavi-Goffer y cols., 2012); posiblemente, la activación del GPR55 induzca la internalización de GAT-1 por medio de estas restructuraciones de actina. No obstante, estas propuestas deben ser cuidadosamente estudiadas para discernir la correcta regulación del GPR55 sobre el GAT-1. Sobre el mecanismo que desencadena el receptor CB1 para bloquear al GAT-3, aún no se tienen datos que puedan explicar dicho evento, por lo cual es importante realizar estudios que expliquen dicha inhibición.

Efecto de la activación de los receptores CB1 y GPR55 sobre la actividad motora de ratas

Debido a la inhibición de la captura de GABA producida por la activación de los receptores CB1 y GPR55, se propone que su activación conllevará a la disminución de la actividad motora de ratas en respuesta al incremento de la concentración de GABA en el espacio sináptico. Por esta razón, se realizó la administración intrapalidal de los agonistas LPI y ACEA, de manera individual y conjunta, para estudiar el efecto que producen sobre la actividad motora. Para probar que los efectos producidos por la activación de los CB1 y GPR55, son consecuencia de la inhibición de la captura de GABA, también se administraron intrapalidalmente los bloqueadores de los GAT-1 y 3.

La activación de los receptores CB1 y GPR55 en el GPe, disminuyó la actividad motora de las ratas en el modelo de campo cerrado de la misma manera en que disminuyó la actividad motora de las ratas administradas intrapalidalmente con los bloqueadores de los GATs- 1 y 3, lo cual, es un indicio de que los fármacos empleados disminuyen la captura de GABA. Para confirmar que el receptor GPR55 inhibe la actividad del GAT-1 y que el receptor CB1 inhibe al GAT-3, se realizó la co-administración de LPI y SKF89976A así como de ACEA y SNAP5114 en el GPe, con

la finalidad de observar si se genera un efecto aditivo u oclusivo sobre los procesos motores.

Las figuras 32 y 33, muestran que la co-administración intrapalidal del agonista del GPR55 y del bloqueador del GAT-1, así como la del agonista CB1 más el bloqueador del GAT-3, disminuye la actividad motora de ratas en condiciones fisiológicas normales, y esta disminución es muy parecida a la que se produjo por la administración individual de cada uno de los fármacos, lo cual indica que tanto el GPR55 como el SKF89976A tienen el mismo blanco molecular que es el GAT-1, mientras que el GAT-3 es el blanco molecular del receptor CB1 y del SNAP-5114.

Debido a que los receptores GPR55 y CB1 inhiben al GAT-1 y GAT-3 respectivamente, se esperaría que la co-activación de dichos receptores en el GPe de ratas, disminuyera la actividad motora de manera aditiva, no obstante, no se registraron cambios sobre la locomoción de los animales. Esto podría deberse a que el GABA liberado de la terminal estriado-palidal, ha llegado a su punto máximo, por lo cual, no se puede registrar el efecto aditivo esperado por la activación de ambos receptores. Sin embargo, es necesario medir la captura de GABA, después de haber activado a los receptores GPR55 y CB1 para poder corroborar esta suposición.

La disminución de la actividad motora en los sujetos de experimentación, se explican por un desbalance en la regulación de la vía directa e indirecta de los GB. El bloqueo de los GATs-1 y 3 en la vía estriado palidal, incrementa la concentración de GABA en el espacio sináptico, lo cual traerá como consecuencia la inhibición de las neuronas del GPe (Kita y Kita, 2011; Jin y cols., 2012). Cuando el GPe se inhibe, la regulación de este núcleo hacia el NST disminuye, por tanto, el NST incrementa su actividad glutamatérgica hacia los núcleos de salida (GPi/SNr) lo cuales a su vez inhiben al tálamo, trayendo como consecuencia la interrupción en la transmisión de la señal química hacia la corteza motora. El resultado de dicha interrupción es la disminución en los procesos motores (Obeso y Lanciego, 2011).

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, proponen que el bloqueo de los receptores GPR55 y CB1, podría ser una terapéutica importante en el tratamiento de ciertas enfermedades de los GB, como la enfermedad de Parkinson, mientras que la activación de estos receptores podría ser de utilidad en la

enfermedad de Huntington, en donde se ha demostrado que el bloqueo del GAT-1, disminuye las características coreas de esta enfermedad (Blázquez y cols., 2011).

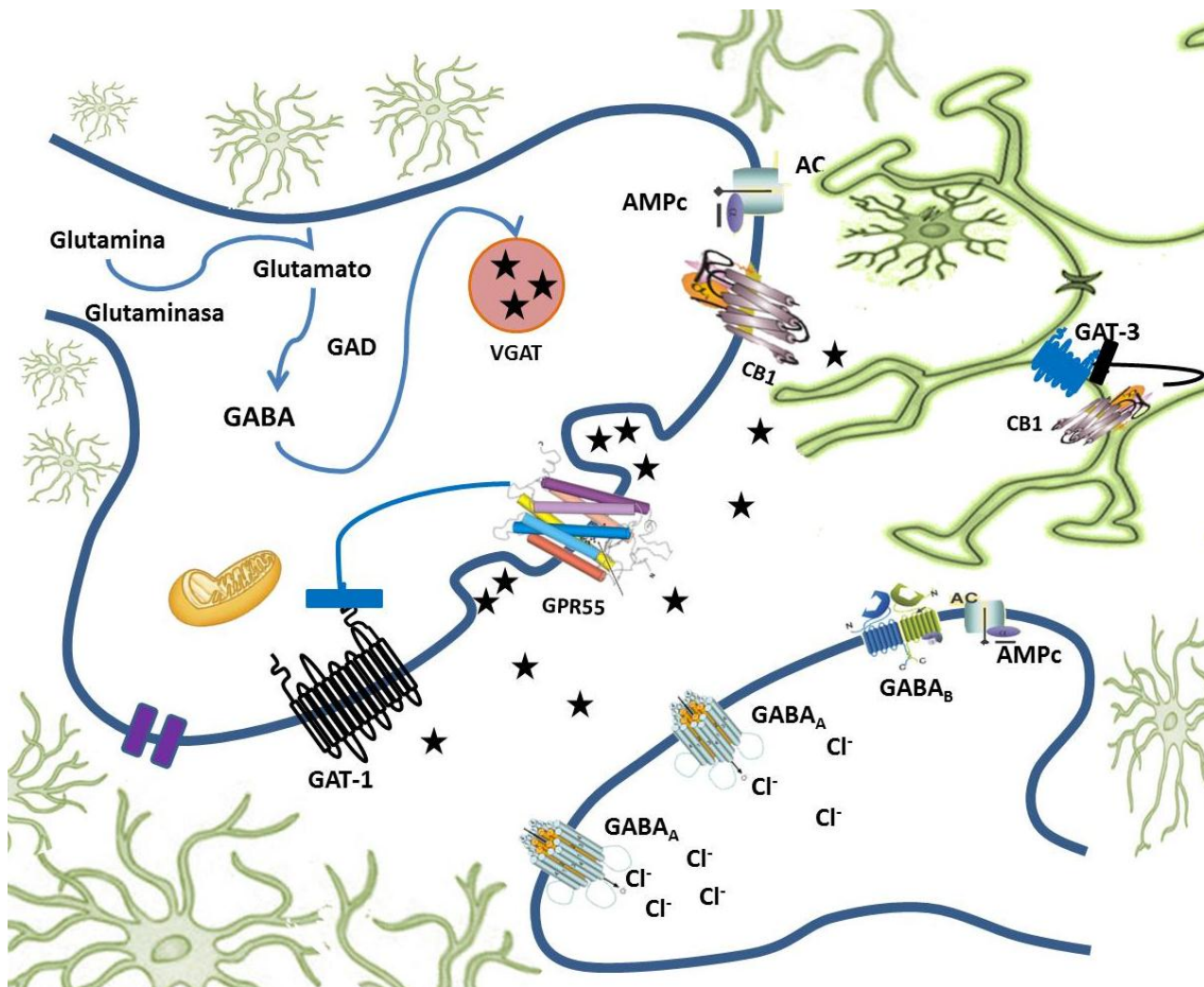


Fig. 34. Esquema hipotético final. Los receptores a cannabinoides CB1 y GPR55 se localizan en las neuronas y astrocitos de la vía estriado palidal de los ganglios basales. La activación de estos receptores modula de manera negativa la función de los transportadores de GABA GAT-1 y GAT-3, localizados a su vez en neuronas y astrocitos respectivamente. El incremento en la concentración de GABA en el espacio sináptico, sobreactiva a los receptores GABA_A del GPe, lo cual resulta en la inhibición de dicho núcleo. La disminución en la actividad del GPe, incrementa la neurotransmisión glutamatérgica del núcleo subtalámico, cuya consecuencia es la sobreactivación de los núcleos de salida GPi/SNr y la disminución de los procesos motores. GABA: ácido γ -aminobutírico, GAD: glutamato descarboxilasa, VGAT: transportador vesicular de GABA, GAT-1: transportador de GABA tipo 1, GAT-3: transportador de GABA tipo 3.

11 CONCLUSIONES

- 1) Los transportadores de GABA 1 y 3, modulan la captura de [³H]GABA, en sinaptosomas y gliosomas de globo pálido externo de ratas intactas, respectivamente.
- 2) La activación de los receptores GPR55, inhibe la captura de [³H]GABA en sinaptosomas, mientras que la activación de los receptores CB1, disminuye la captura de [³H]GABA en gliosomas de globo pálido externo de ratas.
- 3) La activación de los receptores GPR55 en sinaptosomas de globo pálido externo de ratas, no inhibe la captura de [³H]GABA a través de la vía Ac-PKA.
- 4) La vía de la PLC-PKC, no participa en la inhibición de la captura de [³H]GABA mediada por los receptores GPR55 en sinaptosomas de globo pálido externo de ratas intactas.
- 5) La activación de los receptores GPR55 y CB1, disminuye la actividad motora, debido a la inhibición del GAT-1 y GAT-3 respectivamente, en el globo pálido externo de ratas.

12 PERSPECTIVAS

En base a los resultados obtenidos en este proyecto de investigación, se propone estudiar las posibles vías de señalización que se encuentran involucradas en la inhibición de la captura de GABA cuando los receptores CB1 y GPR55 son activados en el GPe de ratas. Dicho estudio permitirá conocer más a fondo la modulación estos receptores sobre la neurotransmisión GABAérgica. Asimismo, se propone estudiar la activación de estos receptores en un modelo de hemiparkinsonismo con la finalidad de conocer si existen cambios en cuanto a su expresión y función.

13 BIBLIOGRAFÍA

1. Acosta-García J., Hernández-Chan N., Paz-Bermúdez F., Sierra A., Erlij D., Aceves J., Floran B. D4 and D1 dopamine receptors modulate [³H] GABA release in the substantia nigra pars reticulata of the rat. *Neuropharmacol* (2009); 57(7-8): 725-730.
2. Alexander G.E., De Long M.R., Strick P.L. Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurosci* (1986); 9: 357-381.
3. Alvano S. Farmacología de la neurotransmisión GABAérgica. Mecanismo de acción de las benzodiazepinas y otros moduladores GABAérgicos. En: Zieher LM. *Psiconeurofarmacología clínica y sus bases neurocientíficas*. 3ª edición. Buenos Aires, Gráfica Siltor (2003); 298-307.
4. Anavi-Goffer S., Baillie G., Irving A.J., Gertsch J., Greig I.R., Pertwee R.G., Ross R.A. Modulation of L- α -Lysophosphatidylinositol/GPR55 mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling by cannabinoids. *The J Biol Chem*. (2012); 287: 91-104.
5. Andradas C., Caffarel M.M., Pérez-Gómez E., Salazar M., Lorente M., Velasco G., Guzman M., Sánchez C. The orphan G protein-coupled receptor GPR55 promotes cancer cell proliferation via ERK. *Oncogene* (2011); 30: 245–252.
6. Araque A., Parpura V., Sanzgiri R.P., Haydon P.G. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *TINS* (1999); 22 (5): 208-215.
7. Araque A., Carmignoto G., Haydon P.G. Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annu Rev Physiol* (2001); 63: 795–813.
8. Avalos-Fuentes A., Loya-López S., Flores-Pérez A., Recillas-Morales S., Cortés H., Paz-Bermúdez F., Aceves J., Erlij D., Floran B. Presynaptic CaMKII α modulates dopamine D3 receptor activation in striatonigral terminals of the rat brain in a Ca²⁺ dependent manner. *Neuropharmacol* (2013); 71: 273-281.
9. Bahena-Trujillo R., Arias-Montaña J.A. [3H]- γ -aminobutyric acid transport in rat substantia nigra pars reticulata synaptosomes: pharmacological characterization and phorbol ester-induced inhibition. *Neurosci Lett* (1999); 274: 119-122.
10. Baker D., Pryce G., Davies W.L., Hiley R. In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *TRENDS Pharmacol Sci* (2006); 27(1): 1-4.
11. Bari M., Bonifacino T., Milanese M., Spagnuolo P., Zappettini S., Battista N., Giribaldi F., Usai C., Bonanno G., Maccarrone M. The endocannabinoid system in rat gliosomes and its role in the modulation of glutamate release. *Cell Mol Life Sci* (2011); 68(5): 833-845.
12. Battaglioli G., Liu H., David L. Martin. Kinetic differences between the isoforms of glutamate decarboxylase: implications for the regulation of GABA synthesis. *J Neurochem* (2003); 86: 879–887.
13. Baufreton J., Kirkham E., Atherton J.F., Menard A., Magill P.J., Bolam J.P., Bevan M.D. Sparse but selective and potent synaptic transmission from the globus pallidus to the subthalamic nucleus. *J Neurophysiol* (2009); 102: 532-545.

14. Beltramo M., di Tomaso E., Piomelli D. Inhibition of anandamide hydrolysis in rat brain tissue by (E)-6-(bromomethylene) tetrahydro-3-(1-naphthalenyl)-2H-pyran-2-one. *FEBS Lett* (1997); 403(3): 263-267.
15. Bennett E.R., Kanner B.I. The Membrane Topology of GAT-1, a (Na⁺+Cl⁻)-coupled γ -Aminobutyric Acid Transporter from Rat Brain. *J Biol Chem* (1997); 272: 1203-1210.
16. Bettler B., Kaupmann K., Mosbacher J., Gassmann M. Molecular structure and physiological functions of GABAB receptors. *Physiol Rev* (2004); 84: 835–867.
17. Björklund A., Dunnett S.B. Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci* (2007); 30(5): 194-202.
18. Blázquez C., Chiarlone A., Sagredo O., Aguado T., Pazos M.R., Resel E., Palazuelos J., Julien B., Salazar M., Börner C., Benito C., Carrasco C., Diez-Zaera M., Paoletti P., Díaz-Hernández M., Ruiz C., Sendtner M., Lucas J.J., de Yébenes J.G., Marsicano G., Monory K., Lutz B., Romero J., Alberch J., Ginés S., Kraus J., Fernández-Ruiz J., Galve-Roperh I., Guzmán M. Loss of striatal type 1 cannabinoid receptors is a key pathogenic factor in Huntington's disease. *Brain* (2011); 134: 119-136.
19. Borden L.A. GABA transporter heterogeneity: pharmacology and cellular localization. *Neurochem Int* (1996); 29: 335-356.
20. Borden L.A., Smith K.E., Hartig P.R., Branchek T.A., Weinshank R.L. Molecular heterogeneity of the γ -aminobutyric acid (GABA) transport system. *J Biol Chem* (1992); 267(29): 21098-21104.
21. Borden L.A., Dhar T.G.M., Smith K.E., Branchek T.A., Weinshank R.L., Gluchowski C. Tiagabine, SK&F89976-A, CI-966, and NNC-711 are selective for the cloned GABA transporter GAT-1. *Eur J Pharmac (Molec Pharmac Section)* (1994); 269: 219-224.
22. Borgkvist A., Marcellino D., Fuxe Kjell., Greengard P., Fisone G. Regulation of DARPP-32 phosphorylation by Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *Neuropharmacol* (2008); 54: 31-35.
23. Bowery N.G., Hill D.R., Hudson A.L., Doble A., Middlemiss D.N., Shaw J., Turnbull M. (–)Baclofen decreases neurotransmitter release in the mammalian CNS by an action at a novel GABA receptor. *Nature* (1980); 283: 92–94.
24. Bowery N.G., Bettler B., Froestl W., Gallagher J.P., Marshall F., Raiteri M., Bonner T.I., Enna S.J. Mammalian γ -aminobutyric acid (B) receptors: structure and function. *Int. Union Pharmacol XXXIII. Pharmacol Rev* (2002); 54: 247–264.
25. Breivogel C.S., Griffin G., Di Marzo V., Martin B.R. Evidence for a New G Protein Coupled Cannabinoid Receptor in Mouse Brain. *Mol Pharm.* (2001); 60:155-163.
26. Breuckel A.I.M., Besselsen E., Ghijsen E.J.M. Synaptosomes: A Model System to Study Release of Multiple Classes of Neurotransmitters. *Methods in Molecular Biology, in Neurotransmitter Methods* (1997); 72:33-47.

27. Bu D.F., Erlander M.G., Hitz B.C., Tillakaratne N.J.K, Kaufman D.L., Wagner-Mcpherson C.B., Evans G.A., Tobin A.J. Two human glutamate decarboxylases, 65-kDa GAD and 67-kDa GAD, are each encoded by a single gene. *Proc Natl Acad Sci USA* (1992); 89: 2115-2119.
28. Callén L., Moreno E., Barroso-Chinea P., Moreno-Delgado D., Cortés A., Mallol J., Casadó V., Lanciego J.L., Franco R., Lluís C., Canela E.I., McCormick P.J. Cannabinoid Receptors CB1 and CB2 Form Functional Heteromers in Brain. *J Biol Chem* (2012); 287(25): 20851-20865.
29. Chaves-Kirsten G.P., Mazucanti C.H., Real C.C., Souza B.M., Britto L.R., Torrão A.S. Temporal changes of CB1 cannabinoid receptor in the basal ganglia as a possible structure-specific plasticity process in 6-OHDA lesioned rats. *Plos One* (2013); 8(10): 1-15.
30. Chebib M., Johnston G.A.R. GABA activated ion channel: Medicinal chemistry and molecular biology. *J Med Chem* (2000); 43: 1427–1447.
31. Chebib M. GABAC receptor ion channels. *Clin and Exp Pharmacol and Physiol* (2004); 31: 800-804.
32. Coiret G., Ster J., Grewe B., Wendling F., Helmchen F., Gerber U., Benquet P. Neuron to astrocyte communication via cannabinoid receptors is necessary for sustained epileptiform activity in rat hippocampus. *Plos One* (2012); 7 (5): 1-8.
33. Corey J.L, Davidson N., Lester H.A., Brecha N., Quick W.M. Protein kinase C modulates the activity of a cloned γ -Aminobutyric acid transporter expressed in xenopus oocytes via regulated subcellular redistribution of the transporter. *J Biol Chem* (1994); 269: 14759-14767.
34. Couve A., Filippov A.K., Connolly C.N., Bettler B., Brown D.A., Moss S.J. Intracellular retention of recombinant GABAB receptors. *J Biol Chem* (1998); 273: 26361–26367.
35. Cravatt B.F., Giang D.K., Mayfield S.P., Boger D.L., Lerner R.A., Gilula N.B. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* (1996); 384: 83–87.
36. Cristóvão-Ferreira S., Vaz S.H., Ribeiro J.A., Sebastião A.M. Adenosine A2A receptors, enhance GABA transport into nerve terminals by restraining PKC inhibition of GAT-1. *J Neurochem* (2009); 109: 336-347.
37. Cristóvão-Ferreira S., Navarro G., Brugarolas M., Pérez-Capote K., Vaz S.H., Fattorini G., Conti F., Lluís C., Ribeiro J.A., McCormick P.J., Casadó V, Franco R, Sebastião AM. A1R–A2AR heteromers coupled to Gs and Gi/o proteins modulate GABA transport into astrocytes. *Purinergic Signal* (2013); 9(3): 433-449.
38. Cruz-Trujillo R., Avalos-Fuentes A., Rangel-Barajas C., Paz-Bermúdez F., Sierra A., Escartín-Perez E., Aceves J., Eriş D., Floran B. D3 dopamine receptors interact with dopamine D1 but not D4 receptors in the GABAergic terminals of the SNr of the rat. *Neuropharmacol* (2013); 67: 370-378.

39. Cui G., Jun S.B., Jin X., Pham M.D., Vogel S.S., Lovinger D.M., Costa R.M. Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature* (2013); 494: 238-245.
40. Deken S.L., Beckman M.L., Boos L., Quick W. Transport rates of GABA transporters: regulation by the N-terminal domain and syntaxin 1A. *Nature neurosci* (2000); 3(10): 998-1003.
41. Deniau J.M., Chevalier G. Dishinhibition as a basis process in the expression of striatal functions. II. The striato-nigral influence of thalamocortical cells of the ventromedial thalamic nucleus. *Brain Res* (1985); 334: 227-233.
42. Deniau J.M., Chevalier G. The lamellar organization of the rat substantia nigra pars reticulata: distribution of projection neurons. *Neurosci* (1992); 46: 361-377.
43. Deumens R., Blokland A., Prickaerts J. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal Pathway. *Exp Neurol* (2002); 175: 303-317.
44. Deutsch D.G., Chin S.A. Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist. *Biochem Pharmacol* (1993); 46: 791-796.
45. Devane W.A., Dysarz F.A. 3rd, Johnson M.R., Melvin L.S., Howlett A.C. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* (1988); 34(5): 605-613.
46. Devane W.A., Hanus L., Breuer A., Pertwee R.G., Stevenson L.A., Griffin G., Gibson D., Mandelbaum A., Etinger A., Mechoulam R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* (1992); 258: 1946-1949.
47. Di Marzo V., Fontana A., Cadas H., Schinelli S., Cimino G., Schwartz J.C., Piomelli D. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* (1994); 372: 686-691.
48. Di Marzo V., Hill M.P., Bisogno T., Crossman A.R., Brotchie J.M. Enhanced levels of endogenous cannabinoids in the globus pallidus are associated with a reduction in movement in an animal model of Parkinson's disease. *FASEB J* (2000); 14: 1432-1438.
49. Durkin M.M., Smith K.E., Borden L.A., Weinshank R.L., Branchek T.A., Gustafson E.L. Localization of messenger RNAs encoding three GABA transporters in rat brain: an in situ hybridization study. *Mol Brain Res* (1995); 33: 7-21.
50. Enz R., Brandstatter J.H., Hartveit E., Wassle H., Bormann J. Expression of GABA receptor rho 1 and rho 2 subunits in the retina and brain of the rat. *Eur J Neurosci* (1995); 7: 1495-501.
51. Enz R., Cutting G.R. Molecular composition of GABAC receptors. *Vision Research* (1998); 38: 1431-1441.
52. Erlander M.G., Tobin A.J. The structural and functional heterogeneity of glutamic acid decarboxylase: a review. *Neurochem Res* (1991); 16: 215-226.

53. Fan H.P., Fan F.J., Bao L., Pei G., SNAP-25/syntaxin 1A complex functionally modulates neurotransmitter gamma-aminobutyric acid reuptake. *J Biol Chem.* (2006); 281(38): 28174-28184.
54. Ferreira S.G., Teixeira F.M., Garção P., Agostinho P., Ledent C., Cortes L., Mackie K., Köfalvi A. Presynaptic CB1 cannabinoid receptors control frontocortical serotonin and glutamate release – species differences. *Neurochem Int* (2012); 61(2): 219-226.
55. Floran B., Aceves J., Sierra A., Martinez-Fong D. Activation of D1 dopamine receptors stimulates the release of GABA in the basal ganglia of the rat. *Neurosci Lett* (1990); 116 (1-2): 136-140.
56. Floran B., Floran L., Sierra A., Aceves J. D2 receptor-mediated inhibition of GABA release by endogenous dopamine in the rat globus pallidus. *Neurosci Lett* (1997); 237: 1-4.
57. Fonseca B.M., Teixeira N.A., Almada M., Taylor A.H., Konje J.C., Correia-da-Silva G. Modulation of the novel cannabinoid receptor - GPR55 – during rat fetoplacental development. *Placenta* (2011); 32: 462-469.
58. Ford L.A., Roelofs A.J., Anavi-Goffer S.A., Mowat L., Simpson D.G.Irving A.J., Rogers M.J., Rajnicek A.M., Ross R.A. A role for L-a-lysophosphatidylinositol and GPR55 in the modulation of migration, orientation and polarization of human breast cancer cells. *BJP* (2010); 160: 762–771.
59. Foster J.D., Vaughan R.A. Palmitoylation controls dopamine transporter kinetics, degradation, and protein kinase C-dependent regulation. *J Biol Chem* (2011); 286(7): 5175-5186.
60. Fowler C.J., Ghafouri N. Does the hydrolysis of 2-arachidonoylglycerol regulate its cellular uptake? *Pharmacol Res* (2008); 58: 72–76.
61. Freeze B.S., Kravitz A.V., Hammack N., Berke J.D., Kreitzer A.C. Control of basal ganglia output by direct and indirect pathway projection neurons. *J Neurosci* (2013); 33 (47):18531-18539.
62. Fuchs H., Hauber W. Dopaminergic innervations of the rat globus pallidus characterized by microdialysis and immunohistochemistry. *Exp Brain Res* (2004); 154: 66-75.
63. Galvan A., Villalba R.M., West S.M., Maidment N.T., Ackerson L.C., Smith Y., Wichmann T. GABAergic Modulation of the Activity of Globus Pallidus Neurons in Primates: In Vivo Analysis of the Functions of GABA Receptors and GABA Transporters. *J Neurophysiol* (2005); 94: 990-1000.
64. Galvan A., Hu X., Smith Y., Wichmann T. Localization and function of GABA transporters in the globus pallidus of parkinsonian monkeys. *Exp. Neurol.* (2010); 223: 505-515.
65. Galvez T., Duthey B., Kniazeff J., Blahos J., Rovelli G., Bettler B., Prezeau L., Pin J.P. Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABAB receptor function. *EMBO J* (2001); 20: 2152–2159.

66. Gaoni Y., Mechoulam R. Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc* (1964); 86: 1646-1647.
67. Gerfen C.R., Young W.S. Distribution of striatonigral and striatopallidal peptidergic neurons in both patch and matrix compartments: an in situ hybridization histochemistry and fluorescent retrograde tracing study. *Brain Res* (1988); 460: 161-167.
68. Gerfen C.R., Engber T.M., Mahan L.C., Susel Z., Chase T.N., Monsma F.J., Sibley D.R. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* (1990); 250: 1429-1432.
69. Gerfen C.R. The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia. *Ann Rev Neurosci* (1992); 15: 285-320.
70. Gerfen C.R., Bolam J.P. The neuroanatomical organization of the basal ganglia. In Steiner H., Kuei Y.T. *Handbook of basal ganglia, structure and function*. (2010). San Diego, CA, pp. 3-23.
71. Gerfen C.R., Surmeier D.J. Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annu Rev Neurosci* (2011); 34: 441-466.
72. Giuffrida A., Parsons L.H., Kerr T.M., Rodriguez de Fonseca F., Navarro M., Piomelli D. Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nature Neurosci* (1999); 2(4): 358-363.
73. Glass M., Felder C.C. Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and Dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: Evidence for a Gs Linkage to the CB1 Receptor. *J. Neurosci.* (1997); 17: 5327-5333.
74. Gomeza J., Giménez C., Zafra F. Cellular distribution and regulation by cAMP of the GABA transporter (GAT-1) mRNA. *Brain Res Mol Brain Res.* (1994); 21(1-2): 150-156.
75. Gomperts B.D., Kramer I.M., Tatham P.E. *Signal Transduction*. Elsevier (2009); San Diego: pp 253-257.
76. González B., Paz F., Floran L., Aceves J., Erij D., Floran B. Adenosine A2A receptor stimulation decreases GAT-1 mediated GABA uptake in the globus pallidus of the rat. *Neuropharmacology* (2006); 51: 154-159.
77. González B., Paz F., Floran L., Aceves J., Erij D., Floran B. Cannabinoid agonist stimulate [3H]-GABA release in the globus pallidus of the rat when Gi Protein- receptor coupling is restricted: Role of dopamine D2 receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2009); 328: 822-828.
78. Grofova I. The identification of striatal and palidal neurons projecting to substantia nigra. An experimental study by means of retrograde axonal transport of horseradish peroxidase. *Brain Res* (1975); 91: 286-291.
79. Grove E.A., Domesick V.B., Nauta W.J.H. Light microscopic evidence of striatal input to intrapallidal neurons of cholinergic cell group Ch4 in the rat: a study employing the anterograde tracer phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L). *Brain Res* (1986); 367: 379-384.

80. Guastella J., Nelson N., Nelson H., Czyzyk L., Keynan S., Miedel M.C., Davidson N., Lester H.A., Kanner B.L. Cloning and expression of a rat brain GABA transporter. *Science* (1990); 249: 1303-1306.
81. Hayashi, T. and Nagai, K. Action of B-aminoacids on the motor cortex of higher animals, especially -amino-O-oxybutyric acid on the real inhibitory principle in brain. *Abstr. XX Int. Physiol. Congr.* (1956): p. 410.
82. Helie S., Chakravarthy S., Moustafa A.A. Exploring the cognitive and motor functions of the basal ganglia: an integrative review of computational cognitive neuroscience models. *Front Comput Neurosci* (2013); 7: 1-16.
83. Henstridge C.M., Balenga N.A.B., Schröder R., Kargl J.K., Platzer W., Martini L., Arthur S., Penman J., Whistler J.L., Kostenis E., Waldhoer M., Irving A.J. GPR55 ligands promote receptor coupling to multiple signalling pathways. *B. J. Pharmacol* (2010); 160: 604–614.
84. Herkenham M., Lynn A.B., Little M.D., Johnson M.R., Melvin L.S., de Costa B.R., Rice K.C. Cannabinoid receptor localization in brain. *Neurobiol.* (1990); 87: 1932-1936.
85. Herkenham M., Lynn A.B., de Costa B.R., Richfield E.K. Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat. *Brain Res* (1991); 547: 267-274.
86. Hernandez-Lopez S., Tkatch T., Perez-Garcia E., Galarraga E., Bargas J., Hamm H., Surmeier D.J. D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca²⁺ currents and excitability via a novel PLC [beta]1-IP3-calcineurin-signaling cascade. *J Neurosci* (2000); 20: 8987– 8995.
87. Herrero M.T., Barcia C., Navarro J.M. Functional anatomy of thalamus and basal ganglia. *Childs Nerv Syst* (2002);18 (8): 386-404.
88. Hillard C.J., Harris R.A., Bloom A.S. Effects of the cannabinoids on physical properties of brain membranes and phospholipid vesicles: fluorescence studies. *J. Pharmacol. Exp. Ther* (1985); 232: 579–588.
89. Hillard C.J., Auchampach J.A. In vitro activation of brain protein kinase c by the cannabinoids. *Biochim. Biophys. Acta.* (1994); 1220: 1631.
90. Howlett A.C. Inhibition of neuroblastoma adenylyl cyclase by cannabinoid and nantradol compounds. *Life Science* (1984); 35: 1803-1810.
91. Howlett A.C. The CB1 cannabinoid receptor in the Brain. *Neurobiol Dis* (1998); 5: 405-416.
92. Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* (2002); 54 (2): 161-202.
93. Howlett A.C. Efficacy in CB1 receptor-mediated signal transduction. *Br J Pharmacol* (2004); 142(8): 1209-1218.

94. Ikegaki N., Saito N., Hashima M., Tanaka C. Production of specific antibodies against GABA transporter subtypes (GAT1, GAT2, GAT3) and their application to immunocytochemistry. *Mol Brain Res* (1994); 26: 47–54.
95. Ingham C.A., Bolam J.P., Smith A.D. GABA-immunoreactive synaptic boutons in the rat basal forebrain: comparison of neurons that project to the neocortex with pallidosubthalamic neurons. *J Comp Neurol* (1988); 273: 263-282.
96. Jarrahian A., Watts V.J., Barker E.L. D2 dopamine receptors modulate G α -Subunit coupling of the CB1 cannabinoid receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2004); 308: 880-886.
97. Jin X.T., Galvan A., Wichmann T., Smith Y. Localization and function of GABA transporters GAT-1 and GAT-3 in the basal ganglia. *Front Neurosci* (2011a); 5(63): 1-10.
98. Jin X.T., Paré J.F., Smith Y. Differential localization and function of GABA transporters, GAT-1 and GAT-3, in the rat globus pallidus. *EJN* (2011b); 33: 1504–1518.
99. Jin X.T., Paré J.F., Smith Y. GABA transporter subtype 1 and GABA transporter subtype 3 modulate glutamatergic transmission via activation of presynaptic GABAB receptors in the rat globus pallidus. *EJN* (2012); 36: 2482–2492.
100. Johnston G. Analogs of GABA as therapeutic and investigational agents. In Martin D.L., Olsen R. *GABA in the Nervous System: The view at fifty years*. Lippincott Williams & Wilkins Publishers, Philadelphia, pp. 65-80, (2006).
101. Kanner B.I. Sodium-coupled neurotransmitter transport: structure, function and regulation. *J. Exp Biol* (1994); 196: 237-249.
102. Kapur A., Zhao P., Sharir H., Bai Y., Caron M.G., Barak L.S., Abood M.E. Atypical Responsiveness of the Orphan Receptor GPR55 to Cannabinoid Ligands. *J.Biol Chem.* (2009); 284: 43: 29817–29827.
103. Kaufman D.L., Houser C.R., Tobin A.J. Two forms of the GABA synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneuronal distributions and cofactor interactions. *J Neurochem* (1991); 56: 720-723.
104. Kaupmann K., Malitschek B., Schuler V., Heid J., Froestl W., Beck P., Mosbacher J., Bischoff S., Kulik A., Shigemoto R., Karschin A., Bettler B. GABA(B) receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature* (1998); 396: 683–687.
105. Kawaguchi Y., Wilson C.J., Emson P.C. Projection subtypes of rat neostriatal matrix cells revealed by intracellular injection of biocytin. *J Neurosci* (1990); 10: 3421-3438.
106. Kawaguchi Y., Kubota Y. Correlation of physiological subgroupings of nonpyramidal cells with parvalbumin- and calbindin D28K-immunoreactive neurons in layer V of rat frontal cortex. *J Neurophysiol* (1993); 70: 387-396.
107. Kersanté F., Rowley S.C., Pavlov I., Gutiérrez-Mecinas M., Semyanov A., Reul J.M., Walker M.C., Linthorst A.C. A functional role for both γ -aminobutyric acid (GABA) transporter-

- 1 and GABA transporter-3 in the modulation of extracellular GABA and GABAergic tonic conductances in the rat hippocampus. *Physiol.* (2013); 15: 2429-2441.
108. Kita H. GABAergic circuits of the striatum. *Progr Brain Res* (1993); 99: 51-72.
109. Kita H., Kitai S.T. Efferent projections of the subthalamic nucleus in the rat: light and electron microscopic analysis with the PHA-L method. *J Comp Neurol* (1987); 260: 435-452.
110. Kita H., Kitai S.T. The morphology of globus pallidus projection neurons in the rat: an intracellular staining study. *Brain Res* (1994); 636: 308-319.
111. Kita H., Kita T. Role of striatum in the pause and burst generation in the globus pallidus of 6-OHDA-treated rats. *Front. In Syst. Neurosci* (2011); 5: 1-11.
112. Kniazeff J., Galvez T., Labesse G., Pin J.P. No ligand binding in the GB2 subunit of the GABAB receptor is required for activation and allosteric interaction between the subunits. *J Neurosci* (2002), 22, 7352–7361.
113. Köfalvi A., Rodrigues R.J., Ledent C., Mackie K., Vizi E.S., Cunha R.A., Sperlagh B. Involvement of cannabinoid receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rodent striatum: A combined immunochemical and pharmacological analysis. *J of Neurosci.* (2005); 25: 2874-2884.
114. Kosak J., Marnett L.J. Inhibition of cyclooxygenase- 2 potentiates retrograde endocannabinoid effects in hippocampus. *Nat Neurosci* (2004); 7: 697-698.
115. Kristensen A.S., Andersen J., Jørgensen T.N., Sørensen L., Eriksen J., Loland C.J., Strømgaard K., Gether U. SLC6 neurotransmitter transporters: structure, function, and regulation. *Pharmacol Rev* (2011); 63: 585-640.
116. Lastres-Becker I., Cebeira M., de Ceballos M., Zeng B-Y., Jenner P., Ramos J.A., Fernández-Ruiz J. Increased cannabinoid CB1 receptor binding and activation of GTP-binding proteins in the basal ganglia of patients with Parkinson's syndrome and of MPTP-treated marmosets. *Eur. J. Neurosci.* (2001); 14: 1827-1832.
117. Lastres-Becker I., Molina-Holgado F., Ramos J.A., Mechoulam R., Fernández-Ruiz J. Cannabinoids provide neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity in vivo and in vitro: Relevance to Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* (2005); 19: 96-107.
118. Lauckner J.E., Hille B., Mackie K. The cannabinoid agonist WIN55, 212-2 increases intracellular calcium via CB1 receptor coupling to Gq/11 G proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2005); 102: 19144-19149.
119. Lauckner J.E., Jensen J.B., Chen H.Y., Lu H.C., Hille B., Mackie K. GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (2008); 105: 2699-2704.
120. Law R.M., Stafford A., Quick M.W. Functional regulation of gamma-aminobutyric acid transporters by direct tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* (2000); 275: 23986– 23991.

121. Lei W., Jiao Y., Del Mar N., Reiner A. Evidence for differential cortical input to direct pathway versus indirect pathway striatal projection neurons in rats. *J Neurosci* (2004); 24: 8289-8299.
122. Li S.P., Park M.S., Yoon H., Rhee K.H., Bahk J.Y., Lee J.H., Park J.S., Kim M.O. Differential distribution of GABA B1 and GABA B2 receptor mRNAs in the rat brain. *Mol Cells* (2003); 16: 40–47.
123. Maneuf Y.P., Nash J.E., Crossman A.R., Brotchie J.M. Activation of the cannabinoid receptor by Δ 9-tetrahydrocannabinol reduces γ -aminobutyric acid uptake in the globus pallidus. *Eur. J. Pharmacol.* (1996); 308: 161-164.
124. Maneuf Y.P., Brotchie J.M. Paradoxical action of the cannabinoid WIN 55, 212-2 in stimulated and basal cyclic AMP accumulation in rat globus pallidus slices. *British J. Pharmacol* (1997); 120: 1397-1398.
125. Martin D.L., Tobin A.J. Mechanisms controlling GABA synthesis and degradation in the brain. In: Martin D.L., Olsen R.W., editors. *GABA in the nervous system: the view at fifty years*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. (2000) pp 25–41.
126. Martin, D.L. and Olsen, R. W. *GABA in the Nervous System: The View at 50 Years*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, (2000).
127. Martín A.B., Fernandez-Espejo E., Ferrer B., Gorriti M.A., Bilbao A., Navarro M., Rodriguez de Fonseca F., Moratalla R. Expression and function of CB1 receptor in the rat striatum: localization and effects on D1 and D2 dopamine receptor-mediated motor behaviors. *Neuropsychopharmacol.* (2008); 33, 1667–1679.
128. Matgorzata F., Matgorzata F. GABAB receptors in drug addiction. *Pharmacological reports* (2008); 60: 755-770.
129. Matsuda L.A., Lolait S.J., Brownstein M.J., Young A.C., Bonner T.I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* (1990); 346, 561-564.
130. Mechoulam R., Ben-Shabat S., Hanus L., Ligumsky M., Kaminski N.E., Schatz A.R. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* (1995); 50: 83–90.
131. Milanese M., Bonifacino T., Zappettini S., Usai C., Tacchetti C., Nobile M., Bonanno G. Glutamate release from astrocytic gliosomes under physiological and pathological conditions. *Int Rev Neurobiol* (2009); 85: 295–318.
132. Minelli A., Brecha N.C., Karschin C., DeBiasi S., Conti F. GAT-1, a high-affinity GABA plasma membrane transporter, is localized to neurons and astroglia in the cerebral cortex. *J Neurosci* (1995); 15:7734 –7746.
133. Minelli A., DeBiasi S., Brecha N.C., Zuccarello L.V., Conti F. GAT-3, a high-affinity GABA plasma membrane transporter, is localized to astrocytic processes, and it is not confined to the vicinity of GABAergic synapses in the cerebral cortex. *J Neurosci.* (1996); 1; 16 (19): 6255-6264.

134. Moldrich G, Wenger T. Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study. *Peptides* (2000); 21: 1735–1742.
135. Munro S., Thomas K.L., Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* (1993); 365: 61-65.
136. Navarrete M., Araque A. Endocannabinoids mediate neuron – astrocyte communication. *Neuron* (2008); 57: 883-893.
137. Navarrete M., Araque A. Endocannabinoids Potentiate Synaptic Transmission through Stimulation of Astrocytes. *Neuron* (2010); 68: 113–126.
138. Neve K.A., Seamans J.K., Trantham-Davidson H. Dopamine receptor signaling. *J Recept Signal Transduct Res* (2004); 24: 165-205.
139. Obeso J.A., Lanciego J.L. Past, present, and future of the pathophysiological model of the basal ganglia. *Front. Neuroanat.* (2011); 5: 1-6.
140. Okunuki, K. Über ein neues Enzym Glutaminocarboxylase. *Bot. Mag.* (1937): 51; 270–278.
141. Oka S., Nakajima K., Yamashita A., Kishimoto S., Sugiura T. Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2007); 362: 928–934.
142. Olsen R.W., Betz H. GABA and glycine. In Siegel G., Albers W., Brady S., Price D, *Basic Neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects. Seventh edition*, New York: Lippincott-Raven, pp 291-300, (2006).
143. Olsen, R. W. and Macdonald, R. L. GABAA receptor complex: structure and function. In: J. Ejeberg, A. Schousboe and P. Krogsgaard Larsen, *Glutamate and GABA Receptors and Transporters: Structure, Function, and Pharmacology*. London: Routledge, pp. 202–235, (2002).
144. Parent A, Hazrati LN. Functional anatomy of the basal ganglia II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry (1995). *Brain Res. Brain. Res. Rev.* 20:128–154.
145. Paxinos G., Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, ed. Academic Press, 4ta. Edición, E.E. U.U. 1998.
146. Penney J.B., Young A.B. Striatal inhomogeneities and basal ganglia function. *Movement Disorders* (1986); 1: 3-15.
147. Perea G., Araque A. Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. *J Neurosci* (2005); 25(9): 2192–2203.
148. Petitet F., Donlan M., Michel A. GPR55 as a New Cannabinoid Receptor: Still a Long Way to Prove It. *Chem Biol Drug Des* (2006); 67: 252–253.
149. Petroff O. GABA and Glutamate in the Human Brain. In *The neuroscientist.* (2002); 8: pp 562-573.

150. Piomelli D., Beltramo M., Glasnapp S., Lin S.Y., Goutopoulos A., Xie X.Q., and Makriyannis A. Structural determinants for recognition and translocation by the anandamide transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1999); 96: 5802–5807.
151. Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signaling. *Nat. Rev. Neurosci.* (2003); 11: 873-874.
152. Quick M.W., Hu J., Wang D., Zhang H.Y. Regulation of a γ -Aminobutyric Acid Transporter by Reciprocal Tyrosine and Serine Phosphorylation. *J Biol Chem* (2004); 279: 5961–15967.
153. Quick M.W. Substrates regulate γ -aminobutyric acid transporters in a syntaxin 1A-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA* (2002); 99: 5686–5691.
154. Quick M.W. The role of snare proteins in trafficking and function of neurotransmitter transporters. *Handb Exp Pharmacol* (2006); 175: 181-196.
155. Rasola A., Galletta L.J., Barone V., Romeo G., Bagnasco S. Molecular cloning and functional characterization of GABA/betaine transporter from human kidney. *FEBS Lett* (1995); 373(3): 229-233.
156. Reiner A., Jiao Y., Del Mar N., Laverghetta A.V., Lei W.L. Differential morphology of pyramidal tract-type and intratelencephalically projecting-type corticostriatal neurons and their intrastriatal terminals in rats. *J Comp Neurol* (2003); 457(4): 420-440.
157. Reiner A. Organization of corticostriatal projection neuron types. In Steiner H., Tseng K.Y. *Hand book of Basal Ganglia Structure and Function*, (NewYork, NY: AcademicPress), (2010); pp 323–340.
158. Rodríguez J.J., Mackie K., Pickel V.M. Ultrastructural localization of the CB1 cannabinoid receptor in mu-opioid receptor patches of the rat Caudate putamen nucleus. *J. Neurosci.* (2001); 21: 823–833.
159. Rodríguez de Fonseca F, Del Arco I, Bermudez-Silva FJ, Bilbao A, Cippitelli A, Navarro M. The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. *Alcohol Alcohol.* (2005); 40(1): 2-14.
160. Romero J, Berrendero F, Pérez-Rosado A, Manzanares J, Rojo A, Fernández-Ruiz JJ, de Yébenes JG, Ramos JA. Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of nigrostriatal dopaminergic neurons increased CB1 receptor mRNA levels in the caudate-putamen. *Life. Sci.* (2000); 66(6):485-494.
161. Romero J., de Miguel R., Ramos J.A., Fernández-Ruiz J.J. The activation of cannabinoid receptors in striatonigral GABAergic neurons inhibited GABA uptake. *Life Sci.* (1998); 62(4): 351-63.
162. Romero J., Lastres-Becker I., de Miguel R., Berrendero F., Ramos J.A., Fernández-Ruiz J. The endogenous cannabinoid system and the basal ganglia: biochemical, pharmacological, and therapeutic aspects. *Pharmacol Ther* (2002); 95: 137– 152.

163. Ross R.A. The enigmatic pharmacology of GPR55. *Cell Press* (2008); 30 (3): 156-163.
164. Ryberg E., Larsson N., Sjogren S., Hjorth S., Hermansson N.O., Leonova J., Elebring T., Nilsson K., Drmota T., Greasley P.J. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br. J. Pharmacol.* (2007); 152: 1092-1101.
165. Salio C, Doly S, Fischer J, Franzoni MF, Conrath M. Neuronal and astrocytic localization of the cannabinoid receptor-1 in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neurosci Lett* (2002); 329:13–16.
166. Sañudo-Peña M.C., Patrick S.L., Khen S., Patrick R.L., Tsou K., Walker J.M. Cannabinoid effects in basal ganglia in a rat mode of Parkinson´s disease (1998); 248: 171-174.
167. Savarese M.T., Fraser C.M. In vitro mutagenesis and the search for structure-function relationships among G protein-coupled receptors. *J Biochem* (1992); 283: 1–19.
168. Sawsdargo M., Nguyen T., Lee D. K., Lynch K.R., Cheng R., Heng H.Q., George S.R., O´Dowd B.F. Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, ΨGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Mol Brain Res* (1999); 64: 193-198.
169. Sharopov S, Chen R, Sun H, Kolbaev SN, Kirischuk S, Luhmann HJ, Kilb W. Inhibition of different GABA transporter systems is required to attenuate epileptiform activity in the CA3 region of the immature rat hippocampus. *Epilepsy Res* (2014); 108(2):182-189.
170. Shivachar A.C. Cannabinoids inhibit sodium-dependent, high-affinity excitatory amino acid transport in cultured rat cortical astrocytes. *Biochem. Pharmacol.* (2007); 15: 73(12): 2004-2011.
171. Silverdale M.A., McGuire S., McInnes S., Crossman A.R., Brotchie J.M. Striatal cannabinoid CB1 receptor mRNA expression in the reserpine-treated rat model of Parkinson´s disease. *Exp Neurol* (2001); 169: 400-406.
172. Staton P., Hatcher J.P., Walker D., Morrison A.D., Shapland E.M., Hughes J.P., Chong E., Mander P.K., Green P.J., Billinton A., Fulleylove M., Lancaster H.C., Smith J.C., Bailey L.T., Wise A., Brown A.J., Richardson J.C., Chesell L.P. The putative cannabinoid receptor GPR55 plays a role in mechanical hyperalgesia associated with inflammatory and neuropathic pain. *Pain* (2008); 139: 225–236.
173. Stella N. Cannabinoid Signaling in Glial Cells. *Glia* (2004); 48: 267–277.
174. Stella N. Cannabinoid and cannabinoid – like receptors in microglia, astrocytes and astrocytomas. *Glia* (2010); 58: 1017-1030.
175. Sugiura T., Kondo S., Sukagawa A., Nakane S., Shinoda A., Itoh K., Yamashita A., Waku K. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* (1995); 215: 89-97.
176. Surmeier D.J., Song W.J., Yan Z. Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons. *J Neurosci* (1996); 16(20): 6579-6591.

177. Svenningsson P., Nishi A., Fisone G., Girault J.A., Nairn A.C., Greengard P. DARPP-32: An integrator of neurotransmission. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (2004); 269-296.
178. Swan M., Najlerahim A., Watson R. E. B. and Bennett J. P. Distribution of mRNA for the GABA transporter GAT-1 in the rat brain: evidence that GABA uptake is not limited to presynaptic neurons. *J. Anat.* (1994); 185: 315–323.
179. Sylantsev S., Jensen T.P., Ross R.A., Rusakov D.A. Cannabinoid – and lysophosphatidylinositol- sensitive receptor GPR55 boosts neurotransmitter release at central synapses. *PNAS* (2013); 110: 5193-5198.
180. Tsou K., Brown S., Sanudo-Pena M.C., Mackie K., Walker J.M. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neurosci* (1998); 83: 393-411.
181. Fuentes J.A., Ruiz-Gayo M. Introducción a la farmacología del sistema nervioso central. Neurotransmisores y receptores. En Velázquez, Lorenzo P., Moreno A., Leza J.C., Lizasoain I., Moro M.A. “Farmacología básica y clínica”. 18º edición, 2ª reimpr- Buenos Aires; Madrid: Médica Panamericana (2008); p 196.
182. Venderova K., Brown T.M., Brotchie J.M. Differential effects of endocannabinoids on [3H]-GABA uptake in the rat globus pallidus. *Exp Neurol* (2005); 194: 284-287.
183. Whyte L.S., Ryberg E., Sims N.A., Ridge S.A., Mackie K., Greasley P.J., Ross R.A., Rogers M.J. The putative cannabinoid receptor GPR55 affects osteoclast function in vitro and bone mass in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* (2009); 106(38): 16511–16516.
184. Wettschureck N., Offermanns S. Mammalian G Proteins and Their Cell Type Specific Functions. *Physiol Rev* (2005); 85: 1159–1204.
185. Xiao Y., Chen Y., Kennedy A.W., Belinson J., Xu Y. Evaluation of Plasma Lysophospholipids for Diagnostic Significance Using Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS) Analyses. *Annals New York academy of sciences* (2000): 242-259.
186. Yamauchi A., Uchida S., Kwon H.M., Preston A.S., Robey R.B., Garcia-Perez A., Burg M.B., Handler J.S, Cloning of a Na⁺- and Cl⁻- dependent betaine transporter that is regulated by hypertonicity. *J Biol Chem* (1992); 267(l): 649-652.

14 APÉNDICES

26 al 30 de septiembre de 2010. Villahermosa, Tabasco



LIII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas



“LA CO-ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES CB1 Y D2 DISMINUYE LA ACTIVIDAD MOTORA POR UN INCREMENTO EN LA LIBERACIÓN DE GABA EN EL GLOBO PÁLIDO EXTERNO”

MUÑOZ G., DE JESÚS L., SANCHEZ R., PAZ F. 2., LIMÓN I. D., FLORÁN B.

Los receptores CB1 y D2 se encuentran co-localizados en la terminal estriado-palidal de los ganglios basales y su actividad en la enfermedad de Parkinson está incrementada, por lo que existe una desregulación en la función motora del globo pálido externo. Estos dos receptores, tienen como función la modulación de la neurotransmisión GABAérgica proveniente del estriado ya que se ha mostrado son capaces de actuar sobre los mecanismos de captura y liberación de este neurotransmisor. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto que tiene la co-activación de los receptores CB1 y D2 en el globo pálido externo (GPe) de ratas con lesión dopaminérgica sobre la captura y la liberación de GABA radioactivo y observar las consecuencias de la co-activación de ambos receptores sobre la actividad motora de ratas lesionadas. Se lesionaron ratas macho Wistar en el haz medial del cerebro con 6-OHDA (8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (AP: -1.8, L: -2.0, P: -6.6). Catorce días posteriores a la lesión se evaluó la conducta de giro inducida por amfetamina (5 mg/kg) y posteriormente se obtuvieron rebanadas del globo pálido externo en donde se realizaron los experimentos de captura y liberación de GABA. En otro grupo de ratas intactas se evaluó la actividad motora en el campo abierto (10 min) y ajuste de pasos para posteriormente lesionarlas con 6-OHDA en el haz medial del cerebro. Catorce días después de la lesión se registró la conducta de giro inducida por amfetamina y luego estos sujetos fueron sometidos nuevamente a las pruebas conductuales. Los animales que registraron más de 10 giros por minuto en la conducta de giro, fueron cánulados en el globo pálido externo (AP: -0.8, L: -2.9, P: -4.2) y nuevamente se evaluó la actividad motora al activar a los receptores CB1 y D2. Finalmente se evaluó la conducta de giro inducida por amfetamina de los animales tratados con los agonistas y antagonistas de los receptores CB1 y D2. Se encontró que la inhibición en la captura de GABA por los receptores CB1 es independiente de los D2, asimismo la activación de los receptores CB1 en ratas lesionadas disminuyó la actividad motora e incrementó la asimetría motora por amfetamina lo que podría estar relacionado con la inhibición en la captura de GABA en el globo pálido externo. Por otro lado la activación de los receptores D2 incrementó la asimetría motora en el campo abierto debido a la inhibición en la liberación de GABA. Finalmente la co-activación de los receptores CB1 y D2 incrementó la asimetría en el ajuste de pasos y el giro inducido por amfetamina debido al incremento en la liberación de GABA. Asimismo es importante hacer notar que el bloqueo de los receptores CB1 incrementa la actividad motora debido al incremento en la captura y la disminución en la liberación de GABA cuantificado en las pruebas neuroquímicas por lo que proponemos que el bloqueo de los receptores CB1 en conjunto a algún agonista dopaminérgico podría mejorar la calidad de vida de los pacientes con enfermedad de Parkinson.



13 al 17 de Noviembre de 2010. San Diego, USA

"Role of CB1 and D2 receptors in globus pallidus on motor activity and GABA uptake and release in hemiparkinsonian rats,"

***M. MUNOZ ARENAS, L. DE JESUS, F. LUNA, F. PAZ, B. FLORAN, I. D. LIMON**

CB₁ receptors are located in the striato-pallidal terminal of the basal ganglia that are involved in control of motor activity. In this same terminal, these receptors are colocalized with D₂ receptors; therefore these participate in the modulation of GABA by increasing its release or inhibit uptake under normal conditions. In motor disorders, such as Parkinson's disease, the role of the colocalization of the CB₁ and D₂ receptors and its consequences on motor activity is not clear. The aim of our work was to study the role of the CB₁ and D₂ receptors on GABA uptake and release in globus pallidus in the motor processes of hemiparkinsonian rats. Wistar male rats were injured in the medial forebrain bundle with 6-OHDA (16 µg / 2 µL) (AP: -1.8, L: -2.0, P: -6.6), after, we obtained globus pallidus slices and perform experiments of GABA uptake and release. Furthermore, motor activity was recorded in intact rats in the open field (10 min) and adjusting stepping test to further injury with 6-OHDA in the medial forebrain bundle. Fourteen days after the injury, we induced turning behavior with amphetamine. Only those animals with more than 10 turning per minute, were cannulated in globus pallidus (AP: -0.8, L: -2.9, P: -4.2). Then, we made local injections of ACEA (a CB₁-receptor agonist), AM251 (a CB₁-receptor antagonist), Quinpirole (a D₂-receptor agonist), and sulpiride (a D₂-receptor antagonist), then, we coadministrated CB₁ and D₂ receptors. We found that intrapallidal injection of ACEA decreased motor activity because CB₁ activation inhibits GABA uptake, and AM251 increases motor activity in rats because this antagonist inhibits GABA release. The coactivation of the CB₁ and D₂ receptors in globus pallidus decreased the motor activity rats because we found an increase in GABA release. The decrease in motor activity probably occurred when we coactivated the CB₁ and D₂ receptors because under these conditions the CB₁ receptors are coupled to the G_{s-olf} protein, so this condition stimulates the release of GABA. We think that the use of the CB₁-receptor antagonists would be a potential tool to increase motor activity and decrease motor asymmetry of hemiparkinsonian rats.

10 al 14 de septiembre de 2011. León, Guanajuato.



IV Congreso Nacional de
Ciencias Fisiológicas



"PAPEL DE LOS RECEPTORES CB1 PRESINÁPTICOS SOBRE LA CAPTURA DE [3H]-GABA Y SUS CONSECUENCIAS SOBRE LA ACTIVIDAD MOTORA DE RATAS HEMIPARKINSONIANAS"

Muñoz G, Paz F, Limón ID, Florán B

Los receptores a cannabinoides de tipo 1 (CB1) se localizan abundantemente en el sistema nervioso central y juegan un papel importante en la regulación de la neurotransmisión GABAérgica de la vía estriado palidal de los ganglios basales tanto en condiciones fisiológicas normales como de hemiparkinsonismo. Se ha demostrado que su activación inhibe la liberación de GABA y que también puede inhibir la captura de este neurotransmisor, sin embargo no se tiene claro cómo se realiza esta cascada de señalización. El objetivo de este trabajo es estudiar la vía de señalización por la cual los receptores CB1 presinápticos del globo pálido de rata, realizan la inhibición en la captura de [³H]-GABA y si este efecto sobre la captura tiene repercusiones en la actividad motora de sujetos de experimentación. Ratas macho Wistar fueron sometidas a cirugía estereotáxica, por la cual se formaron dos grupos de experimentación (control y problema) al administrar 2 µL de vehículo (ácido ascórbico) o de la neurotoxina 6-OHDA (16 µg/ 2 µL) en el haz medio del cerebro para reproducir un modelo de hemiparkinsonismo. Catorce días posteriores a la cirugía, los sujetos de experimentación de los dos grupos fueron sometidos a la conducta de giro inducida por amfetamina (5 mg/kg sc). Las ratas que realizaron más de 10 giros por minuto durante 80 minutos fueron incluidas en la siguiente etapa del experimento que consistió en someter a los sujetos de experimentación a una segunda cirugía estereotáxica (26 días postlesión) con la finalidad de implantar una cánula en el globo pálido a través de la cual, se realizó la administración de SKF89976A y de ACEA los cuales son un inhibidor específico de la proteína de captura de GABA (GAT-1) y el agonista específico de los receptores CB1. Se evaluó la actividad motora de los sujetos de experimentación en el modelo de campo abierto durante 15 minutos. Treinta y tres días postlesión, los sujetos de experimentación fueron nuevamente evaluados en la conducta de giro inducida por amfetamina (5 mg/kg sc) más la administración intrapalidal de SKF89976A o ACEA. Con la finalidad de estudiar el papel de los receptores CB1 presinápticos de la vía estriado palidal, se realizaron sinaptosomas de globo pálido de ratas intactas, los cuales se utilizaron para los experimentos neuroquímicos de captura de [³H]-GABA. Se observó una disminución de la actividad motora de sujetos de experimentación del grupo control y el grupo hemiparkinsonico, cuando se activaron a los receptores CB1 del globo pálido. Asimismo se registró un incremento de la asimetría motora en los grupos de experimentación. Los experimentos neuroquímicos muestran que los receptores CB1 presentes en los sinaptosomas de globo pálido no son los responsables de inhibir a la GAT-1, por lo que se propone que son los CB1 presentes en la glía los que se encargan de inhibir la captura e incrementar el GABA en el globo pálido, lo que explicaría la disminución de la actividad motora observada en los grupos de experimentación. Debido a que la administración de AM 251 disminuye la captura de [³H]-GABA en los sinaptosomas de globo pálido, se propone la existencia de otro receptor a cannabinoides denominado GPR55.



12 al 16 de noviembre de 2011, Washington, D.C., USA

Role of presynaptic CB1 receptors on the motor activity in hemiparkinsonian rats and its relation with GABA transporter GAT-1

***M. MUNOZ ARENAS, F. PAZ, B. FLORAN, I. D. LIMON**

The external globus pallidus (GPe) of basal ganglia has abundantly expression of CB1 receptors, which play an important role in motor control because its activation produces hipokinesia in animal models, probably because their inhibitory effect on GABA uptake. However, we don't know what GABA transporter (GAT) is modulated by CB1 receptors. The aim of this work was: to activate CB1 receptors in GPe, to evaluate its motor effects and determine if this effects is mediate by GAT-1 inhibition. Two groups of Wistar male rats were subject to stereotaxic surgery in the medial forebrain bundle (MFB). One group, was infused with 2 μ L of vehicle (0.01% ascorbic acid) and the second group with 6-OHDA (16 μ g / 2 μ L). After fourteen days, both groups of rats were evaluated for turning behavior induced by methamphetamine (5 mg / kg sc). The rats which recorded more than 700 turns in 80 minutes were implanted with a cannula in the Gpe for to study the motor effects of CB1 receptors and GAT-1 activation. We evaluated the motor activity of rats in the open field test for 15 minutes and in the turning behavior test. We test the infusion of SKF89976A (10 μ M) a specific inhibitor of GAT-1 or ACEA (1 μ M) a specific agonist of CB1 receptors. ACEA administration in the rat GPe caused a decrease of 90 % in the number of visited squares in controls animals, and 85 % in hemiparkinsonian rats. In other hand, motor asymmetry increased in 36 % in control and 107 % in hemiparkinsonian rats. When we evaluated the effect of SKF89976A in the control group, we found that rats decrease visited squares (89 %) and rearing (74 %) with respect to the control and increased turning behavior of 43 %. Finally, in a third group of intact rats, we determine if GAT-1 is present in GPe. We obtain GPe synaptosomes and we studied the [3H]-GABA uptake. In [3H]-GABA uptake, we observed that a free Na⁺ inhibited the uptake of [3H]-GABA (56 %) and the low temperature (4°C) decrease this effect too (67 %). Although, infusion of nipecotic acid (100 μ M) and SKF89976A (10 μ M) decreased [3H]-GABA uptake in 49 % and 75 %, respectively. These results indicate GAT-1 in GPe terminals and those CB1 receptors could inhibit them and that these effect increase GABA concentration that causes motor activity decrease.



13 al 17 de Octubre de 2012, Nueva Orleans., USA

NEUROSCIENCE 2012

GAT-1 but not GAT-3 modulates GABA uptake in the presynaptic terminal of globus pallidus of the rats

***M. MUNOZ ARENAS, F. PAZ, B. FLORAN, I. D. LIMON**

The external globus pallidus (GPe) of the basal ganglia has GAT-1 and GAT-3 γ -aminobutyric acid (GABA) transporters, modulation of GABA transport by presynaptic CB1, and A_{2A} receptors has been suggested and thereby modulating GABAergic transmission, however, we don't know what are the signaling pathways by which transporters are regulate. The aim of this work is to know the modulation of GATs in the GPe of the rats and the motor consequences after the use of GAT blockers. We obtained synaptosomes of GPe of male Wistar rats and studied [³H] GABA uptake to understand the role of PKA or PKC in the modulation of transport. In parallel, a second group of rats were subject to stereotaxic surgery to implant a cannula in the GPe (AP: -0.5; L: -2.9; P: -4.2). Seven days after the implant, rats were intrapallidally injected with the blocker of GAT-1 SKF89976A and we evaluated the motor behavior in the open field test. GABA transport at synaptosomes was Na⁺ and temperature (4°C) dependent since decrease the uptake of [³H]GABA by 68% and 57%, respectively. In the same way, pharmacology treatment with nipecotic acid (100 μ M) and SKF89976A (10 μ M) also decrease [³H]GABA uptake in 51% and 75%, respectively. GAT-1 is present in the pallidal terminal because SNAP-5114 (a selective GAT-3 blocker, 1 and 10 μ M) didn't cause modify [³H]GABA uptake, however the administration of SKF89976A (1 and 10 μ M) inhibited the uptake (66% and 81%, respectively). On the other hand treatment with forskoline or 8Br-AMPC (an activator of adenylyl cyclase and an activator of PKA, respectively) didn't modify the uptake of [³H]GABA. PKC activation with PMA (100 nM), inhibited the uptake of [³H]GABA in 21% and the inhibitor of PKC (Gö6983 100 nM) didn't cause changes in the uptake. On the other hand, we didn't find change in the uptake of [³H]GABA when we activate CB1 and A_{2A} receptors. Finally, injection of 1 μ L of SKF89976A (10 μ M) in the GPe decreased the number of visited squares (90%), the rearing (62%) and increased the tortions (200%) in the open field test. We propose that PKC inhibits GAT-1 which is present in synaptic terminal of the GPe. The inhibition of GAT-1 will cause an increment of GABA in the synaptic cleft of GPe that will cause an activation of indirect pathway of basal ganglia which explains the inhibition of the motor activity in the rats.

I Congreso FALAN **Cancún 2012**
November 4 to 9
55 Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas
Neurociencias y Neurobiología de México
Federación de Asociaciones Latinoamericanas y del Caribe de Neurociencias

GABA uptake in the rat globus pallidus terminals is modulated by GAT-1 but not by GAT-3

M. MUÑOZ-ARENAS (1), F. PAZ (2), I. MARTÍNEZ (3), B. FLORAN (2), I. D. LIMON (1)

GABA transporters (GAT-1, 2, 3 and BGT-1) are essential for termination of synaptic transmission. GAT-1 and GAT-3 are present in the external globus pallidus (GPe) of the basal ganglia (BG) and it has been suggested that their uptake activity, is modulated by CB1 and A2A receptors, however, we don't know the signaling mechanisms that regulate these transporters. The aim was to study GATs modulation in the GPe of the rats and their effect on motor activity. Synaptosomes of GPe of male Wistar rats were used to study the [3H]GABA uptake and the effect of activation of PKA or PKC was tested. On the other hand, rats were implanted with a cannula in the GPe, and after, rats were intrapallidally injected with the GAT-1 blocker SKF89976A (10 μ M) and we evaluated the motor behavior in the open field test. [3H]GABA uptake decrease by free sodium solution (68%) and low temperature (57%). GATs blocker nipecotic acid (100 μ M) and decrease [3H]GABA uptake by 51%. The selective GAT-1 blocker SKF89976A dose dependent decrease GABA uptake (100 μ M, 75%, 10 μ M, 66% and 1 μ M 81%). GAT-3 blocker (SNAP5114, 1 and 10 μ M) didn't modify [3H]GABA uptake. The activation of adenylyl cyclase and PKA (with forskoline or 8Br-AMPC respectively) didn't modify the uptake of [3H]GABA. PKC activation with PMA (100 nM), inhibited the uptake of [3H]GABA in 21%. We didn't find change in the uptake of [3H]GABA with the activation of CB1 and A2A receptors. Finally, injection of SKF89976A (10 μ M) in the GPe decreased the number of squares (90%), the rearing (62%) and increased the tortions (200%) in the open field. GAT-1 transporter mediated GABA uptake in GPe terminals and determinates changes in motor behavior.



1 al 5 de septiembre de 2013. Tlaxcala, Tlaxcala.



56

congreso
nacional
de ciencias
fisiológicas



**El bloqueo de los transportadores de GABA en el globo pálido de rata,
disminuye la actividad motora**

GUADALUPE MUÑOZ ARENAS, F. PAZ-BERMUDEZ, B. FLORAN, I. D. LIMON.

Los transportadores conocidos como GAT-1 y GAT-3, se encargan de regular la concentración de GABA extracelular en el globo pálido (GP) al capturarlo para su posterior degradación. Recientemente, se ha demostrado que los receptores CB1, inhiben la captura de GABA de manera importante en este núcleo de los ganglios basales, los cuales se encargan de modular la actividad motora. No obstante, a nivel motor, no se tienen reportes acerca del papel que juegan estos transportadores y si existe relación con la hipoactividad producida por los receptores CB1. El objetivo de este trabajo fue estudiar el papel de los transportadores de GABA del GP sobre la modulación de la actividad motora de ratas intactas, además, estudiar si la activación del receptor CB1 mimetiza el efecto de los GAT-1 y GAT-3. Se utilizaron ratas macho Wistar las cuales fueron canuladas en el GP, de acuerdo a las coordenadas propuestas por Paxinos y Watson. Siete días después de la cirugía, se realizó una microinyección (1 μ L) en el GP con los diferentes fármacos de estudio conocidos como SKF89976A (bloqueador GAT-1), SNAP5114 (bloqueador GAT-3) y ACEA (agonista CB1) a concentraciones de 10 μ M los bloqueadores y 1 μ M el agonista CB1. Tres minutos después de la administración, se evaluó la actividad motora en campo cerrado durante una hora. 24 horas después, las ratas fueron administradas nuevamente en el GP y se evaluó la actividad motora en el campo abierto por un lapso de 15 min. Los bloqueadores de los transportadores de GABA, disminuyeron la actividad motora de las ratas de manera significativa (46 y 49 % respectivamente), asimismo, la activación de los receptores CB1, disminuyó de manera similar la actividad motora de las ratas con respecto al bloqueo de los transportadores (30 %). Estos eventos conductuales indican que la modulación GABAérgica por medio del mecanismo de captura en el globo pálido, tiene efectos motores importantes. Es por ello, que los receptores CB1 y los transportadores de GABA pueden ser un blanco terapéutico importante en el tratamiento de enfermedades de los ganglios basales.

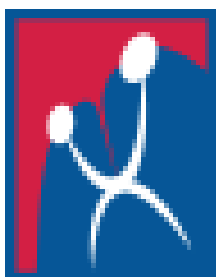


13 al 17 de Octubre de 2013, San Diego, California, USA

Blockade of GAT-1 and GAT-3 transporters in rat the globus pallidus, decreases motor activity.

M. MUNOZ ARENAS, F. PAZ-BERMUDEZ, B. FLORAN, I. D. LIMON

GAT-1 and GAT-3 transporters modulate γ -aminobutyric acid (GABA) uptake in the globus pallidus. Also G protein coupled presynaptic A_{2A} and CB1 receptors activation, blocked GABA transport. The aim of this work was to study the role of GABA transporters in the motor activity of normal rats and if CB1 receptor activation mimics effects of transporters. Male Wistar rats were unilaterally microinjected into the globus pallidus with different agents that block GABA transporters or activate CB1 receptors, and motor behavior was evaluated in the dark field test for one hour. Twenty four hours after evaluation, were microinjected into the globus pallidus again, and they were introduced in open field test and video recorded in a total of 15 min. Injection of 1 μ L of SKF89976A (10 μ M) a GAT-1 blocker, SNAP5114 (10 μ M) a GAT-3 blocker, and ACEA (1 μ M) a CB1 agonist, decreased the motor activity in both dark and open field test in a similar way. These data suggested that modulation of GABA transport in the globus pallidus has important effects on motor behavior.



NEUROSCIENCE
2014



SOCIETY for
NEUROSCIENCE

15 al 19 de Noviembre de 2014, Washington DC, USA

CB1 and GPR55 receptors regulate GABA uptake in gliosomes and synaptosomes respectively in the rat globus pallidus.

M. MUNOZ ARENAS, A. BAEZ CORDERO, R. SANCHEZ-ZAVALA, F. PAZ-BERMUDEZ, D. LIMON, B. FLORAN.

Globus pallidus express GABA transporters: GAT-1 and GAT-3 in neural terminals and glial cells respectively. GABA concentration in the synaptic cleft is regulated by these transporters and regulates motor behavior. In addition, it has been shown that GABA uptake is modulated by the different compounds acting on cannabinoid receptors. Therefore, the aim of this work was to study the role of CB1 and GPR55 receptors on the activity of GAT-1 and GAT-3 in the globus pallidus of the rat. [3H]GABA uptake was measured after activating the CB1 and GPR55 receptors in synaptosomes (nerve terminals) and gliosomes (enriched astrocytes membrane somas) from globus pallidus of normal rats. We found that CB1 receptor activation inhibits [3H]GABA uptake mediated by GAT-3 in gliosomes, while compounds with selectivity of GPR55 inhibit [3H]GABA uptake mediated by GAT-1 in synaptosomes. We propose that cannabinoid compounds blocks GABA uptake at GAT-1 and GAT-3 in the GP by means of the different location of transporters in cellular elements. This study also shows the importance of the endocannabinoid system in the control of the GABAergic transmission of the globus pallidus.