



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACIA
LABORATORIO DE NEUROFARMACOLOGÍA**

TESIS PROFESIONAL

***Efecto de la activación y bloqueo del receptor CB1 en el Globo Pálido externo
sobre las habilidades motoras finas de ratas hemiparkinsonianas***

Para obtener el título de
Licenciada en Farmacia

Presenta
Ana Silvia Báez Cordero

Directores de tesis
D.C. Ilhuicamina Daniel Limón Pérez de León
Laboratorio de Neurofarmacología, FCQ-BUAP

D.C. María de Guadalupe Muñoz Arenas
Departamento de Farmacia, FCQ-BUAP

DICIEMBRE DE 2015

A la memoria de mi abuelo Cantú

A mis padres y hermanos



El presente trabajo fue apoyado por el proyecto CONACYT 169023



La sustentante del presente trabajo fue apoyada con la beca otorgada por la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado BUAP a través del proyecto NAT-VIEP-BUAP 2015



La sustentante del presente trabajo fue apoyada parcialmente por el programa Beca Tesis 2015 otorgado por el Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Puebla

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 La Enfermedad de Parkinson	2
1.2 Anatomía funcional de los ganglios basales	3
1.2.1 El Globo Pálido externo	5
1.3 El sistema Endocanabinoide	7
1.3.1 El receptor CB1 en los ganglios basales.....	10
1.4 El sistema endocanabinoide en la enfermedad de Parkinson.....	13
1.5 La 6-OHDA como modelo de estudio de la enfermedad de Parkinson.....	15
2. JUSTIFICACIÓN	16
3. HIPÓTESIS	17
4. OBJETIVOS	17
4.1 Objetivo general	17
4.2 Objetivos particulares.....	17
5. METODOLOGÍA	18
5.1 Diagrama general de trabajo	18
5.2 Sujetos de experimentación.....	18
5.2 Estudio conductual en el modelo de la escalera.....	18
5.2.1 Control de peso	19
5.2.2 Entrenamiento.....	19
5.3 Lesión con 6-OHDA en el haz medial del cerebro	20
5.4 Conducta de giro	20
5.5 Evaluación de las habilidades motoras finas	21
5.6 Implante de cánula en el GPe por cirugía estereotáxica.....	21
5.7 Preparación y administración de los fármacos en el Globo Pálido externo	22
5.8 Inmunohistoquímica para el receptor CB1	22
5.9 Tinción de Nissl modificada	23

6. RESULTADOS	24
6.1 Sitio de Implantación de la cánula en el Globo Pálido Externo	24
6.2 Efecto de la activación y bloqueo del receptor CB1 en el Globo Pálido externo sobre las habilidades motoras finas de ratas hemiparkinsonianas	24
6.3 Efecto de la activación y bloqueo del receptor CB1 en el Globo Pálido externo sobre los movimientos finos de ratas hemiparkinsonianas.....	27
6.4 Efecto de la activación y bloqueo del receptor CB1 en el Globo Pálido externo sobre la conducta de giro de ratas hemiparkinsonianas	33
6.5 Efecto de la activación y bloqueo del receptor CB1 sobre su expresión en el Globo Pálido externo de ratas hemiparkinsonianas	35
7. DISCUSIÓN	39
8. CONCLUSIONES	46
9. PERSPECTIVAS	46
10. BIBLIOGRAFÍA	47
11. CONGRESOS	53

ABREVIATURAS

2-AG: 2-araquidonilglicerol

6-OHDA: 6-Hidroxidopamina

Ac: Adenil ciclasa

ACEA: Araquidonil-2-cloroetilamida

AEA: N-araquidonil etanolamida o anandamida

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

AMPC: Adenosil monofosfato cíclico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

BSA: Albúmina sérica de bovino

DA: Dopamina

DAPI: 4,6-diamino-2-fenilindol

DMSO: Dimetilsulfóxido

EC₅₀: Concentración efectiva 50

EP: Enfermedad de Parkinson

FAAH: Amido hidrolasa de los ácidos grasos

GABA: Ácido γ -amino butírico

GAT: Transportador de GABA

GB: Ganglios Basales

GPe: Globo Pálido externo

GPI: Globo Pálido interno

IC₅₀: Concentración inhibitoria 50

LPI: Lisofosfatidilinositol

MAGL: Monoacilglicerol lipasa

MAPK: Proteínas cinasas activadas por mitógeno

MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

NEM: Neuronas espinosas medianas

NST: Núcleo subtalámico

PKA: Proteína cinasa dependiente de AMPC

PPE: Proteína precursora de encefalina

PV: Parvalbúmina

RCB1: Receptor a canabinoides tipo 1

RCB2: Receptor a canabinoides tipo 2

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SEC: Sistema endocanabinoide

SNc: Sustancia nigra *pars compacta*

SNC: Sistema nervioso central

SNr: Sustancia nigra *pars reticulata*

THC: Δ^9 -tetrahidrocanabinol

1. INTRODUCCIÓN

Todas las conductas implican movimiento y dependen de la contracción muscular controlada por los sistemas motores. Estos sistemas están organizados jerárquicamente desde los circuitos espinales que controlan los reflejos automáticos, hasta los centros superiores del tronco cerebral y la corteza motora. Además de los tres niveles jerárquicos (médula espinal, tronco cerebral y corteza) otras dos estructuras encefálicas regulan también la función motora: el cerebelo y los ganglios basales (GB).

Los ganglios basales y el cerebelo juegan un papel crítico en el refinamiento y modelado de los movimientos. Ambos reciben numerosas proyecciones de la corteza cerebral, y ambos vuelven a proyectar a la corteza a través del tálamo. Sin embargo, existen tres diferencias entre las conexiones de los GB, el cerebelo y la corteza. Primero, los GB reciben aferencias de toda la corteza cerebral, mientras que el cerebelo solo recibe del área sensoriomotora. Segundo, las eferencias del cerebelo llegan a la corteza motora y premotora, y las de los GB no solo llegan a esas dos áreas corticales, sino también, a la corteza de asociación prefrontal. Finalmente, el cerebelo recibe información somatosensorial directamente desde la médula espinal y la mayoría de sus eferencias y aferencias las establece con núcleos troncoencefálicos que tienen conexiones directas con la médula espinal. En contraste, los GB tienen escasas conexiones con el troncoencefálico y carecen por completo de conexiones directas con la médula espinal.

Estas diferencias sugieren que el cerebelo regula directamente la ejecución del movimiento, mientras que los GB están implicados en aspectos cognitivos superiores al control motor, tales como la planificación y ejecución de estrategias motoras complejas.

Los centros motores superiores son responsables de dos aspectos fundamentales del movimiento voluntario. En primer lugar, se planifica de acuerdo con los objetivos del movimiento, y en segundo, se modula según las características concretas del medio. Por lo que pueden clasificarse, de acuerdo al tamaño del músculo esquelético involucrado, la fuerza aplicada o la magnitud del espacio dentro del cual se lleva a cabo el movimiento, en movimientos gruesos o finos. Los movimientos gruesos involucran grandes grupos musculares que implican un grado de esfuerzo significativo para controlar los cambios de posición del cuerpo y mantener el equilibrio y la postura.

Los movimientos finos involucran pequeños grupos musculares para realizar pequeños movimientos del cuerpo, principalmente del antebrazo, manos y dedos, implican movimientos limitados que no requieren un gran esfuerzo pero si un alto grado de precisión, como por ejemplo, escribir o tocar algún instrumento, entre muchas otras actividades.

Manipular un objeto de manera diestra es una acción compleja y requiere de una gran coordinación de las extremidades superiores. Si bien se ha descrito que en los monos y los seres humanos la red frontal-parietal tiene un papel clave para alcanzar y sujetar objetos estáticos, recientemente Mosier y cols. (2011), en un estudio de imagen funcional en humanos encontraron la activación de una red cortical-estriatal-cerebelosa, y que la actividad de los GB se incrementaba conforme se requería una mayor destreza para manipular un objeto. Este hallazgo fue importante, ya que el cerebelo, en lugar de los GB, tradicionalmente es asociado con la coordinación motora fina. Una perspectiva importante sobre el papel de los circuitos corticales-GB en los movimientos finos se dio a partir del estudio de los pacientes con enfermedad de Parkinson (EP), los cuales presentan déficits motores para realizar movimientos de alcance y captura de objetos.

1.1 La Enfermedad de Parkinson

La EP, descubierta por James Parkinson en 1817, es la segunda enfermedad crónica neurodegenerativa más común en el adulto mayor, que afecta principalmente las conductas motoras de los sujetos que la padecen. En México, se ha estimado una prevalencia entre 40 a 50 casos por cada 100,000 habitantes al año. En el mundo debido al aumento de la tasa de sobrevivencia y con esto al aumento de enfermedades degenerativas, la EP que afectaba de 4.1 a 4.6 millones de personas mayores de 50 años en el 2010, se considera que para el año 2030 esta cifra se duplicará, lo que conlleva a un problema de salud pública (México, 2010).

Los síntomas característicos de la EP son temblor, rigidez, dificultad para iniciar la marcha, pérdida de reflejos posturales y bradicinesia (González Esparza, 2008), y se deben a un desequilibrio en la comunicación sináptica del circuito de los GB, por la pérdida de dopamina (DA), debido a la muerte progresiva e irreversible de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra *pars compacta* (Kirik y cols., 1998).

1.2 Anatomía funcional de los ganglios basales

Los GB son un grupo de núcleos subcorticales localizados en la base de los hemisferios cerebrales que se encuentran interconectados en una serie de circuitos en paralelo (Albin y cols., 1989), estas conexiones actúan mediante la integración, el procesamiento y la conducción de la información para su participación en procesos motores, cognitivos y emocionales (Obeso y Lanciego, 2011).

El circuito de los GB está conformado por el núcleo caudado y putamen, en mamíferos inferiores como los roedores estas estructuras se encuentran juntas y reciben el nombre de estriado; el globo pálido constituido por un segmento interno (GPi) y otro externo (GPe); el núcleo subtalámico (NST), y la sustancia nigra, en la cual se distinguen claramente dos subnúcleos, la sustancia nigra *pars compacta* (SNc) y la sustancia nigra *pars reticulata* (SNr) (Groenewegen, 2003).

El estriado constituye el principal núcleo de entrada al circuito de los ganglios basales, en el que las diferentes aferencias que convergen en él se encuentran topográficamente organizadas. A su vez el GPi y la SNr representan los principales núcleos de salida de los GB, formando un complejo que proyecta la información procesada hacia el tálamo y posteriormente a la corteza cerebral, cerrando así el circuito (Albin y cols., 1989).

El elemento neuronal predominante del estriado son las neuronas espinosas medianas (NEM) GABAérgicas, que reciben e integran la mayor parte de las entradas tanto del estriado como de la corteza y el tálamo, y que a su vez proyectan hacia el globo pálido y la sustancia nigra. Asimismo, el estriado contiene un pequeño número de interneuronas colinérgicas, GABAérgicas y otro pequeño grupo que tienen somatostatina y neuropéptido Y (Albin y cols., 1989).

Entre el estriado y GPi/SNr existen dos sistemas paralelos de proyección que surgen de dos poblaciones neuronales diferentes. El primero es la denominada vía directa, la cual se origina de las NEM que contienen sustancia P y dinorfina como neuromoduladores, además, expresan predominantemente al receptor dopaminérgico D1 y esta vía se comunica directamente con GPi/SNr. Las NEM que dan lugar al segundo sistema de proyección, la vía indirecta, expresan principalmente el receptor dopaminérgico D2 y proyectan sus terminales al GPe como una primera estación de paso en esta vía. El GPe conformado por neuronas

GABAérgicas tiene eferencias al NST, y este a su vez se comunica con los núcleos GPi/SNr (Groenewegen, 2003). Una vez que la información ha sido procesada en este circuito, se dirige desde el complejo de salida (GPi/SNpr) hacia varias regiones, de las cuales se destacan el área ventral-anterior (VA), ventral-lateral (VL) y mediodorsal (MD) del tálamo (Albin y cols., 1989); las cuales, a su vez forman conexiones con la corteza, mediante eferencias excitatorias, y así influir sobre las proyecciones que descienden desde el tallo cerebral hasta el aparato motor espinal, para la modulación del movimiento o una conducta determinada (Parent y Hazrati, 1995).

La transferencia de la información cortical y talámica hacia el cuerpo estriado es modulada por las proyecciones dopaminérgicas de la SNc, a través de diferentes tipos de receptores de dopamina (principal neurotransmisor modulador del funcionamiento de los GB) en las dos poblaciones de las NEM. La activación de los receptores D1 (acoplados a proteínas G estimuladoras) en el estriado, estimulan la actividad de las NEM de la vía directa, lo cual inhibe la actividad de las neuronas del GPi/SNr de los GB, y ocasionará una desinhibición de los núcleos del tálamo; por lo que, dadas sus proyecciones glutamatérgicas, se producirá una estimulación de la corteza motora para facilitar la ejecución de los movimientos. Por el contrario, los receptores D2 (acoplados a proteínas G inhibitorias) suprimen la actividad de la vía indirecta, dicho evento provocará una disminución en la actividad de las proyecciones subtalámico excitatorias hacia los núcleos GPi/SNr (Figura 1A), lo cual produce un bloqueo de la inhibición del movimiento (Obeso y Lanciego, 2011).

La pérdida de las neuronas dopaminérgicas en la EP, repercute en una serie de cambios neuroquímicos que involucran a todo el circuito de los GB, y que provoca una disminución en la producción de DA. Si bien la literatura describe el agotamiento de este neurotransmisor de manera central en el estriado, también se ha determinado que en el GPe de pacientes con EP se pierde alrededor de un 80% de la DA (Rajput y cols., 2008). Con lo cual se produce una mayor actividad de la vía indirecta y a su vez, una disminución de la actividad de la vía directa hacia los núcleos de salida (GPi/SNr) de los GB (Figura 1B). El aumento de la actividad de las neuronas de proyección de la vía indirecta, es decir, un incremento de la liberación de GABA por las NEM, dará lugar a la desinhibición del NST y en consecuencia producirá un aumento del disparo excitatorio al complejo GPi/SNr. Por lo que el resultado final es la inhibición de los núcleos VA/VL/MD del tálamo, provocando una disminución en la actividad de las neuronas glutamatérgicas tálamo-corticales, que se verá reflejado en una disminución de los

movimientos, característico en los sujetos con la enfermedad de Parkinson (Albin y cols., 1989, Kita y Kita, 2011).

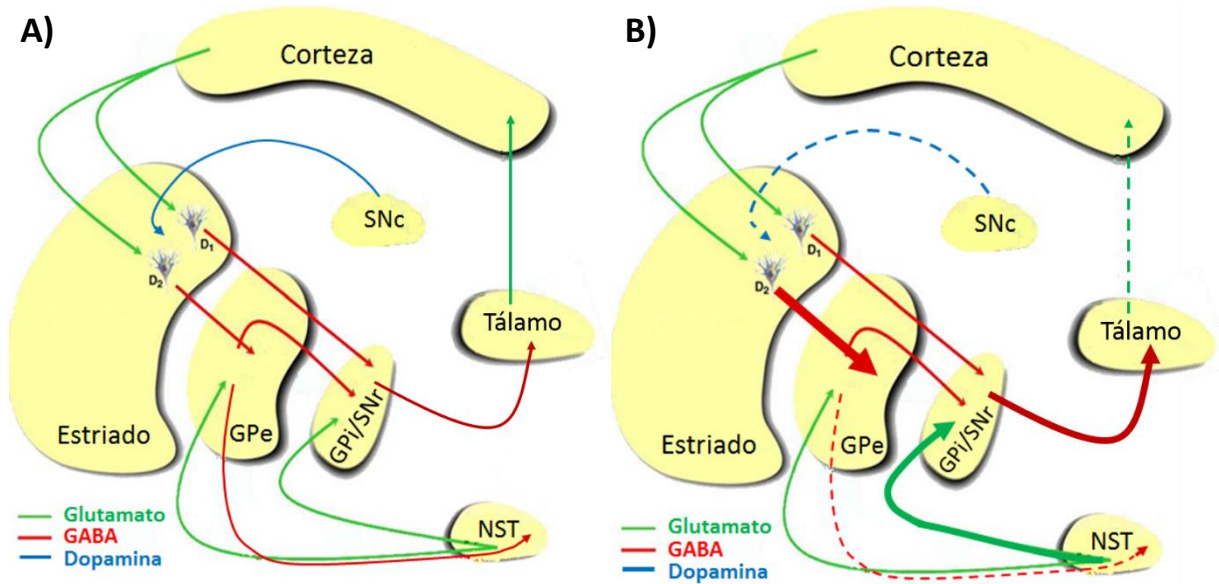


Figura 1. Circuito de los Ganglios Basales en: A) Estado normal. La vía directa que expresa principalmente al receptor D1 y va del estriado a los núcleos de salida GPi/SNr favorece el movimiento, mientras que la vía indirecta, que expresa al receptor D2 desde el estriado al GPe-NST y por último hacia GPi/SNr, lo inhibe. **B) La Enfermedad de Parkinson.** Debido a una disminución de la concentración de dopamina en el circuito de los GB ocurre una sobreactivación de la vía indirecta que repercute en una mayor inhibición del movimiento, característico en los pacientes con dicha patología (Modificado de Obeso, 2006).

1.2.1 El Globo Pálido externo

El GPe es actualmente considerado como un centro integrador para coordinar la actividad neuronal a través de los GB (Mallet y cols., 2012), debido a que envía proyecciones importantes al tálamo y al núcleo pedunculopontino, además, de tener conexiones recíprocas tanto con el estriado como con el NST (Parent y Hazrati, 1995). Asimismo, el GPe y el NST, envían sus proyecciones sobre la misma región de los núcleos de salida GPi/SNr, formando un microcircuito donde el GPe se encuentra colocado estratégicamente para controlar la actividad de salida de los GB (Obeso y cols., 2006).

Recientemente, Mallet y cols. (2012), describen la existencia de dos poblaciones neuronales distintas en el GPe de ratas tratadas con 6-OHDA (modelo que asemeja la enfermedad de Parkinson) que si bien ambas son GABAérgicas, tienen propiedades neuroquímicas, anatómicas y electrofisiológicas distintas. Las neuronas de la primera población llamadas prototípicas en su mayoría expresan parvalbúmina (PV) e inervan principalmente al

NST, GPi y SNr. La segunda población, la describen como un nuevo tipo neuronal que denominan arkypalidal, expresa la proteína precursora de encefalina (PPE), lo que sugiere que utilizan encefalina como un co-transmisor y que proporcionan exclusivamente una entrada masiva al estriado que inerva tanto a interneuronas como neuronas de proyección (Figura 2).

Si bien se ha descrito que la información evocada por las NEM del estriado hacia las dos vías de comunicación de los GB es modulada por las proyecciones dopaminérgicas de la SNc, actualmente, también se sabe que existe una innervación dopaminérgica en el GPe, así como en el GPi, el NST y otras estructuras subcorticales, provenientes de los axones de la SNc (Obeso y cols., 2006). Una proporción de estas fibras son colaterales de los axones de proyección nigro-estriatal, sin embargo, también hay una proyección nigro-palidal específica, por lo que la administración local de cocaína o amfetamina en el GPe de ratas provoca incrementos en los niveles de DA (Fuchs, 2005). Se ha demostrado que la dopamina también juega un papel importante en la función del GPe, ya que la administración local de DA produce cambios en la tasa de disparo neuronal, disminuyendo la liberación de GABA en rebanadas de GPe (Florán y cols., 1997). En un modelo de rata lesionada con 6-OHDA la administración de dopamina intrapalidal, así como de agonistas de los receptores D2 en el globo pálido externo, provoca una recuperación del 50 al 60% en las habilidades motoras finas evaluadas en el modelo de la escalera (Galván y cols., 2001). Por lo tanto, se ha demostrado un control directo de la actividad dopaminérgica palidal, que coloca al GPe como un núcleo crucial para la regulación de la vía indirecta y en consecuencia para el correcto control de los movimientos.

El GPe a través de sus conexiones con el NST ha sido implicado consistentemente en el inicio y mantenimiento de la disfunción motora en la EP (Gittis y cols., 2014). El GPe es la fuente principal de la transmisión GABAérgica en el NST, debido a que cada neurona del NST recibe la entrada de hasta 60 neuronas del GPe y, en consecuencia los múltiples contactos sinápticos ejercen una poderosa influencia inhibitoria sobre el NST (Baufreton y cols., 2009).

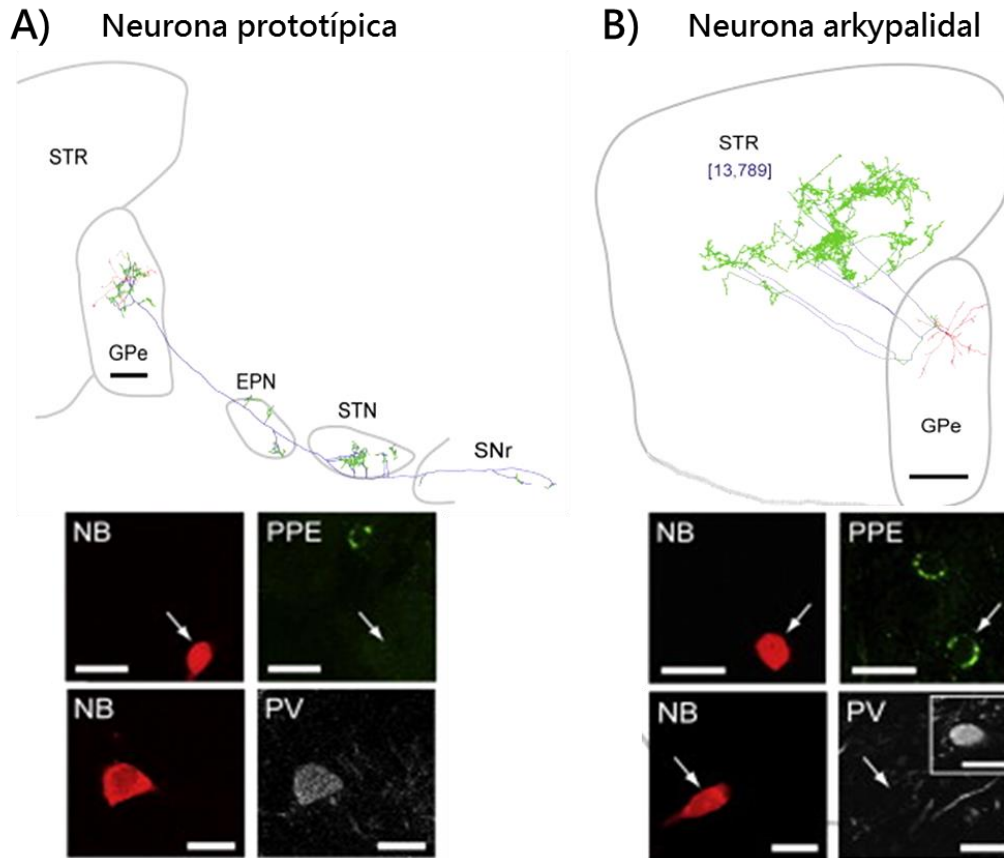


Figura 2. Neuronas prototípicas y arkypalidales del Globo Pálido externo. A) Neurona prototípica, reconstrucción completa con el marcador neurobiotina (NB), se muestra que proyecta al núcleo subtalámico (STN), núcleo entopeduncular (NEP) y *sustancia nigra reticulada* (SNr). Fotomicrografías de fluorescencia confocal que muestran la co-localización de NB con la expresión de parvalbúmina (PV) pero no con la proteína precursora de encefalina (PPE). B) Neurona arkypalidal, reconstrucción completa con el marcador neurobiotina (NB), se muestra que proyecta de manera masiva al estriado (STR). Fotomicrografías de fluorescencia confocal que muestran la co-localización de NB con la expresión de la PPE pero no con la proteína PV (Modificado de Mallet y cols., 2012).

1.3 El sistema Endocanabinoide

La planta *Cannabis sativa* ha sido considerada desde la antigüedad como uno de los recursos terapéuticos más importantes en la medicina popular. Al consumo de la marihuana se le atribuyen numerosos efectos en el cerebro, incluyendo entre otros, euforia, incremento del apetito, deterioro en la memoria y alteraciones de la coordinación motora. Sin embargo, fue hasta el descubrimiento de su principal componente psicoactivo, el Δ^9 -tetrahidrocanabinol (THC) (Gaoni y Mechoulam, 1964), que se comenzó con una serie de investigaciones para esclarecer los mecanismos por los cuales la marihuana ejercía sus efectos farmacológicos, y que dieron paso al descubrimiento del sistema endocanabinoide (SEC). El SEC es considerado un

sistema de señalización de lípidos ubicuo, constituido por dos tipos de receptores, el CB1 y CB2, sus ligandos endógenos (endocannabinoides), la proteína de recaptura de dichos compuestos y las enzimas encargadas de su metabolismo (Rodríguez de Fonseca y cols., 2005). Recientemente se ha descrito la existencia de otros receptores como posibles candidatos para formar parte del sistema endocanabinoide, como el GPR55, sin embargo, aún estos receptores no forman oficialmente parte de este sistema (Brown, 2007).

Los endocannabinoides son compuestos endógenos sintetizados y liberados principalmente por las neuronas, capaces de activar sus receptores de membrana y actuar como mensajeros retrógrados de la señalización neuronal (Piomelli, 2003). Los principales endocannabinoides son moléculas derivadas del ácido araquidónico conjugadas con etanolamina o glicerol. De los cuáles, los más abundantes son la anandamida (AEA) y el 2-Araquidonoilglicerol (2-AG) (Rodríguez de Fonseca y cols., 2005). Su síntesis se produce a partir de precursores fosfolipídicos de membrana y las enzimas responsables de ello son estimuladas por altas concentraciones de Ca^{2+} , de manera que estos compuestos son biosintetizados y liberados al medio extracelular donde y cuando se requieran (Carriba-Domínguez, 2007).

En el SNC, la concentración de AEA es 200 veces menor que la de 2-AG (Sugiura y cols., 1995). Se ha descrito que la estimulación eléctrica de cortes de hipocampo incrementa la liberación para 2-AG pero no para anandamida (Stella y cols., 1997), mientras que en el estriado, la activación del receptor de dopamina D2 incrementa la concentración de anandamida pero no de 2-AG (Giuffrida y cols., 1999), de manera que la existencia de diferentes rutas para la síntesis de estos compuestos sugiere que ambos endocannabinoides pueden operar de manera independiente (Carriba-Domínguez, 2007). La acción de los endocannabinoides se termina mediante un mecanismo de captura a través de un transportador, el cual hasta el momento no ha sido caracterizado, sin embargo, se ha demostrado que este mecanismo es saturable, depende de la temperatura y es selectivo de sustrato (Di marzo y cols., 1994; Beltramo y cols., 1997). Una vez en el medio intracelular los endocannabinoides son degradados por enzimas bien caracterizadas, la amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) que se encarga principalmente de la degradación de la anandamida y se encuentra anclada intracelularmente en las membranas postsinápticas (Cravatt y cols., 1996), mientras que el 2-araquidonilglicerol es degradado por la monoacilglicerol lipasa (MAGL) y se encuentra en las membranas de neuronas presinápticas (Dinh y cols., 2002).

Los cannabinoides, tanto endógenos como exógenos, interaccionan con los receptores a cannabinoides de siete dominios transmembranales acoplados a una proteína $G_{i/o}$ (inhibe a la enzima adenilatociclasa). Los receptores CB1 se distribuyen abundantemente en el SNC (Figura 4), principalmente en el hipocampo, la corteza, los GB y el cerebelo (Herkenham y cols., 1990). Por otra parte, los receptores CB2 se han identificado en células del sistema inmune y en distintos tejidos como bazo, timo, amígdalas, médula ósea y páncreas (Munro y cols., 1993)

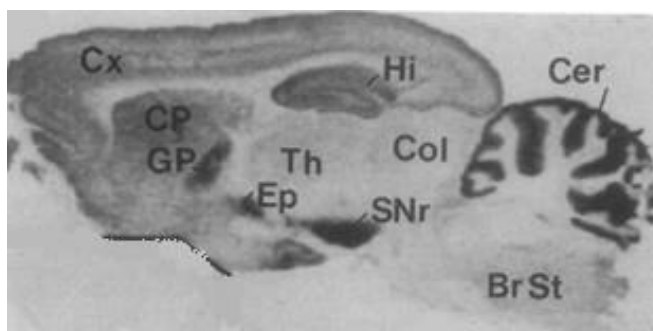


Figura 4. Localización de los receptores CB1 en el cerebro de rata. Autorradiografía de la unión de [3 H]-CP55,940 en un corte sagital de cerebro de rata. Las zonas que se observan en color gris representan las regiones en donde hay una mayor densidad de los receptores CB1, corteza (Cx), hipocampo (Hi), caudado-putamen (CP), globo pálido (GP), núcleo entopeduncular (Ep), tálamo (Th), sustancia nigra reticulata (SNr), cerebelo (Cer) y tallo cerebral (BrSt) (Tomado de Herkenham y cols., 1990).

El descubrimiento del sistema endocanabinoide concuerda con los efectos que ejercen los cannabinoides sobre la modulación de la función motora, debido a que la mayor densidad de los receptores de cannabinoides se encuentran en los GB (GPe y SNr) y cerebelo (Herkenham y cols., 1990), además, se han descrito cambios en la expresión de los receptores CB1 en los GB tanto, de seres humanos afectados por enfermedades neurodegenerativas como en roedores con trastornos motores inducidos experimentalmente, lo que hace del sistema endocanabinoide una diana importante en el control del movimiento (More y Choi, 2015).

Los ligandos endógenos AEA y 2-AG también están presentes en los GB (Bisogno y cols., 1999), de los cuales el GPe y la SNr son los núcleos que contienen los niveles más altos de endocannabinoides, principalmente de 2-araquidonilglicerol. Además, el N-araquidonilfosfatidiletanolamina, precursor de la AEA, también se encuentra en los GB, lo que sugiere la síntesis *in situ* de este neuromodulador (Romero y cols., 2002).

Debido a estas evidencias, se ha sugerido que el estudio del sistema endocanabinoide, como principal neuromodulador en el SNC, y de nuevos compuestos que actúen en dicho

sistema, permitirán comprender mejor la patología de algunas enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson y, además proponer posibles blancos de estudio para la búsqueda de nuevas terapias farmacológicas.

1.3.1 El receptor CB1 en los ganglios basales

El receptor CB1 fue clonado como un receptor huérfano a partir de una biblioteca de cDNA de corteza cerebral de rata, al utilizar una sonda de oligonucleótidos derivados de un miembro de los receptores acoplados a proteína G (Matsuda y cols., 1990). Este receptor consta de 472 aminoácidos en humanos y 473 en rata y ratón, con un extremo N-terminal extracelular, 7 dominios transmembranales hidrofóbicos α -hélice conectados por tres asas intracelulares y tres extracelulares, y un extremo C-terminal intracelular (Figura 5). Como se describió anteriormente el receptor CB1 pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas $G_{i/o}$ (Howlett, 1998).

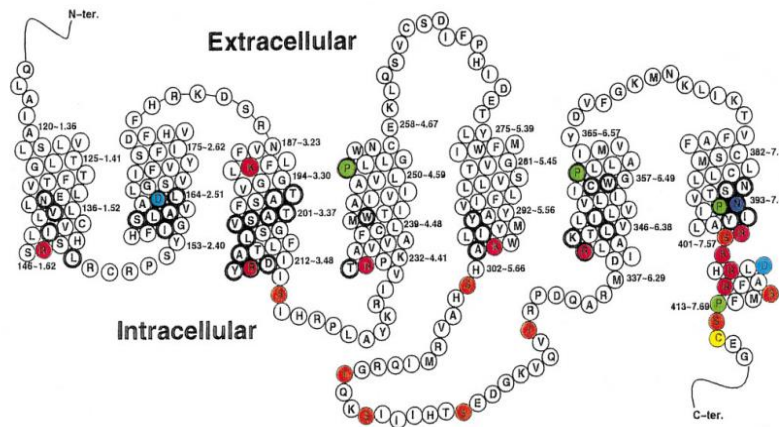


Figura 5. Modelo del receptor CB1 en el SNC. Se muestra el extremo N-terminal extracelular, los 7 dominios transmembranales y el extremo C-terminal intracelular (Tomado de Howlett, 1998)

Los receptores a cannabinoides presentan propiedades únicas como su conservación a lo largo de la evolución, especialmente el receptor CB1 ya que tanto en humano, como rata y ratón tienen de un 97 a 99% de identidad en su secuencia de aminoácidos. Además, el receptor CB1 es el receptor más abundante de los acoplados a proteína G, ya que se expresan de 10 a 50 veces por encima de los transmisores clásicos tales como los receptores de dopamina o de opioides (Herkenham y cols., 1991; Rodríguez de Fonseca y cols., 2005).

La activación del receptor CB1, debido a su acople a una proteína $G_{i/o}$, inhibe a la enzima adenilatoclasa (Ac) y disminuye la formación de AMPc, lo que resulta en una disminución en

la fosforilación por la proteína cinasa A (PKA). Por otra parte, las subunidades $\beta\gamma$ de la proteína $G_{i/o}$, bloquean la actividad de los canales de Ca^{2+} tipo N y P/Q y estimulan la apertura de los canales de K^+ . Estas acciones han sugerido que los cannabinoides juegan un importante papel como moduladores de la liberación de neurotransmisores. Sin embargo, su activación también se ha relacionado con la modulación positiva de la vía de las cinasas activadoras de mitógenos (MAPK). Además, bajo ciertas condiciones, los receptores CB1 pueden estimular la formación de AMPc mediante el acoplamiento a una proteína G_s , por lo que todos estos mecanismos de señalización pueden modular la comunicación sináptica y la expresión génica neuronal (Felder y cols., 1998; Rodríguez de Fonseca y cols., 2005; Svíženská y cols., 2008).

En el SNC, la amplia y altamente organizada distribución de los elementos de señalización de endocannabinoides, principalmente en terminales GABAérgicas y glutamatérgicas, refleja claramente la importancia de este sistema en la transmisión sináptica (Rodríguez de Fonseca y cols., 2005). Además, estudios autorradiográficos sobre la distribución del ARNm, y de la expresión del receptor CB1 muestran una falta de correlación entre la distribución de ambos marcadores, por lo que se sugiere que la proteína se sintetiza en los cuerpos celulares y posteriormente se transporta hacia los axones y las terminales sinápticas (Egertová y Elphick, 2000). De manera, que en los GB, las transcripciones de ARNm del receptor CB1 están presentes en el estriado, (Mailleux y Vanderhaeghen, 1992; Van Weas y cols., 2012) mientras que la proteína del receptor CB1 se expresa principalmente en las terminales de las NEM que proyectan al GPe, GPi y SNr. Por lo que al lesionar el estriado con ácido iboténico la presencia de los RCB1 en los núcleos de salida disminuye, ya que estos se localizan en las terminales presinápticas y es por esta característica que su función es modular la neurotransmisión (Herkenham y cols., 1991) (Figura 6).

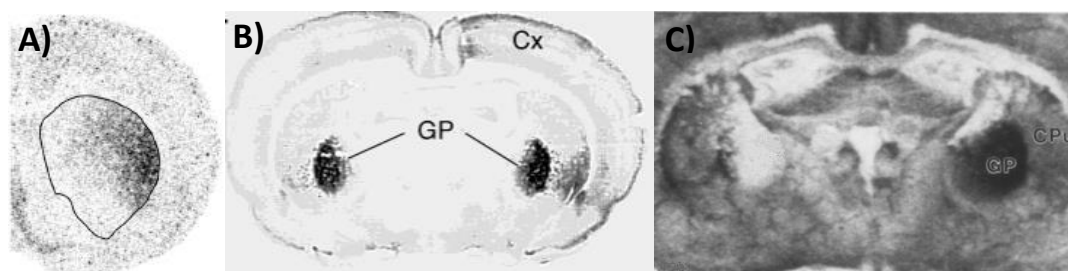


Figura 6. Expresión del ARNm y la proteína del receptor CB1. Se muestra en A) Una autorradiografía del ARNm para el receptor CB1 en estriado de rata (Van Weas y cols., 2012), B) Una fotomicrografía para la expresión del receptor CB1 en el globo pálido externo (GP) (Egertová y Elphick, 2000), y en C) Una autorradiografía del receptor CB1 posterior a una lesión estriatal con ácido iboténico, lo que ocasiona una disminución de su expresión en el GP (Herkenham y cols., 1991).

Debido a los efectos inhibitorios sobre la Ac, la activación de corrientes de K⁺ y la inhibición de la entrada de Ca²⁺ en las células, provocados por la activación del receptor CB1, el efecto final es una hiperpolarización en las terminales presinápticas (Romero y cols., 2002). Por lo cual, se ha demostrado que la estimulación del receptor CB1 en estriado de rata disminuye la liberación de [³H]GABA y [³H]Glutamato (Köfalvi y cols., 2005) y, de [³H]GABA en el globo pálido externo (González y cols., 2009) (Figura 7A). Además de modular la liberación de neurotransmisor, también se ha descrito que la activación de los receptores CB1, en el GPe de rata, potencian la transmisión GABAérgica debido a una disminución en la captura de este neurotransmisor (Maneuf y cols., 1996; Muñoz-Arenas, 2010) (Figura 7B). Sin embargo, bajo ciertas condiciones los receptores CB1 pueden estimular la formación de AMPc (Felder y cols., 1998), ya que tienen la capacidad de interactuar con otros receptores, como el de dopamina D2, cambiar su acople a una proteína G_s, y en consecuencia producir un incremento en la liberación de GABA en el GPe (González y cols., 2009; Muñoz-Arenas, 2010).

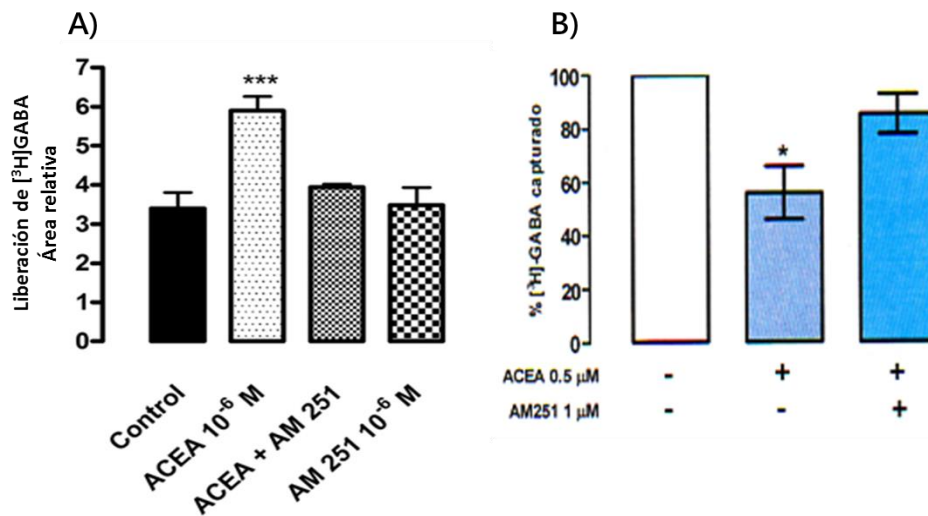


Figura 7. La activación del receptor CB1 en el GPe modula la neurotransmisión GABAérgica. Se muestra en A) Liberación de [³H]GABA y B) Captura de [³H]GABA en el GPe de rata. Tomado y modificado de González y col., 2009 (A); Muñoz-Arenas, 2010 (B).

Como resultado de la participación de los receptores CB1 en los procesos de liberación y captura en la neurotransmisión de los GB, también se ha demostrado que cannabinoides sintéticos, fitocannabinoides y los endocannabinoides tienen potentes efectos en la actividad motora, en su mayoría, efectos inhibitorios (Sañudo-Peña y cols., 1999). Por lo tanto, se ha descrito que la estimulación de los receptores CB1 puede producir, entre otros efectos, la

disminución de la actividad espontánea y la inducción de catalepsia, potenciación de la hipocinesia inducida por reserpina, la atenuación de comportamientos estereotipados espontáneos e inducidos, la reducción de la hiperlocomoción inducida por anfetamina y una interrupción en el control motor fino (Romero y cols., 2002; McLaughlin y cols., 2000).

1.4 El sistema endocanabinoide en la enfermedad de Parkinson

Más allá de los cambios observados en la expresión de los receptores CB1 en los GB durante el envejecimiento normal (Van Weas y cols., 2012) también se han descrito que ocurren en enfermedades neurodegenerativas. Diversos estudios sobre el estado del SEC en pacientes con la EP indican resultados similares a los observados en modelos animales con esta enfermedad. En el estriado de pacientes con EP, así como en primates no humanos tratados con MPTP existe un incremento de los receptores CB1 (Lastres-Becker y cols., 2001; Van Laere y cols., 2012), en ratas lesionadas con 6-OHDA también se observó un incremento en la expresión del receptor CB1 en etapas iniciales a la inducción de la lesión dopaminérgica, sin embargo, en estados más prolongados ocurre un efecto contrario, ya que la expresión de los mismos disminuye (Chaves-Kirsten y cols., 2013).

También se ha sugerido que los cambios en el sistema endocanabinoide pueden participar en la generación de los síntomas o como parte de un mecanismo de compensación para contrarrestar el desequilibrio en la fisiopatología de los ganglios basales en la EP (Romero y cols., 2002). Ya que además de las alteraciones en la expresión del receptor CB1, otros estudios han mostrado que la dopamina juega un papel importante en la regulación del sistema endocanabinoide, de manera que las variaciones en la actividad de la transmisión dopaminérgica producen cambios en los niveles de endocanabinoides, como un incremento de la concentración de anandamida en el líquido cefalorraquídeo de pacientes no tratados con EP, o cambios en los transportadores de membrana de los endocanabinoides y la actividad de la amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) (Giuffrida y cols., 1999; Gubellini y cols., 2002; Pisani y cols., 2011).

Al emplear un modelo de EP en rata producido por la administración aguda de reserpina, Di Marzo y cols. (2000) mostraron un aumento en los niveles de endocanabinoides en los GB (Figura 8A), acompañado de una conducta de hipolocomoción, mientras que la estimulación de los receptores dopaminérgicos fue acompañado por una restauración de los contenidos de

endocannabinoides normales, y que al bloquear a los receptores CB1 conjuntamente con la activación de los receptores dopaminérgicos incrementó la actividad motora de las ratas (Figura 8B). Otro estudio realizado por Muñoz Arenas en el 2010, en un modelo de rata lesionada con 6-OHDA, demostró que la estimulación del receptor CB1 en el GPe, induce aún más un efecto de hipolocomoción, característico en la enfermedad de Parkinson. Este efecto, posiblemente se deba a un bloqueo en la captura de GABA, que provocará un incremento de los niveles de este neurotransmisor en el espacio sináptico y genere una sobre activación de la vía indirecta, con lo cual se manifiesta una inhibición del movimiento, además, observó que dicho evento fue revertido con el antagonismo de este receptor, permitiendo un restablecimiento de la actividad motora, el cual se evidencia con una disminución de la asimetría motora de ratas hemiparkinsonianas (Figura 8C). Por lo tanto, se ha sugerido que la transmisión endocanabinoide en los GB se vuelve hiperactivo en la EP, y esto se relaciona con la hipocinesia que caracteriza a esta enfermedad (Romero y cols., 2002), lo cual apoyaría la idea de que los antagonistas del receptor CB1 pueden ser útiles en el tratamiento del deterioro motor en la enfermedad de Parkinson (Romero y cols., 2002; Muñoz-Arenas, 2010).

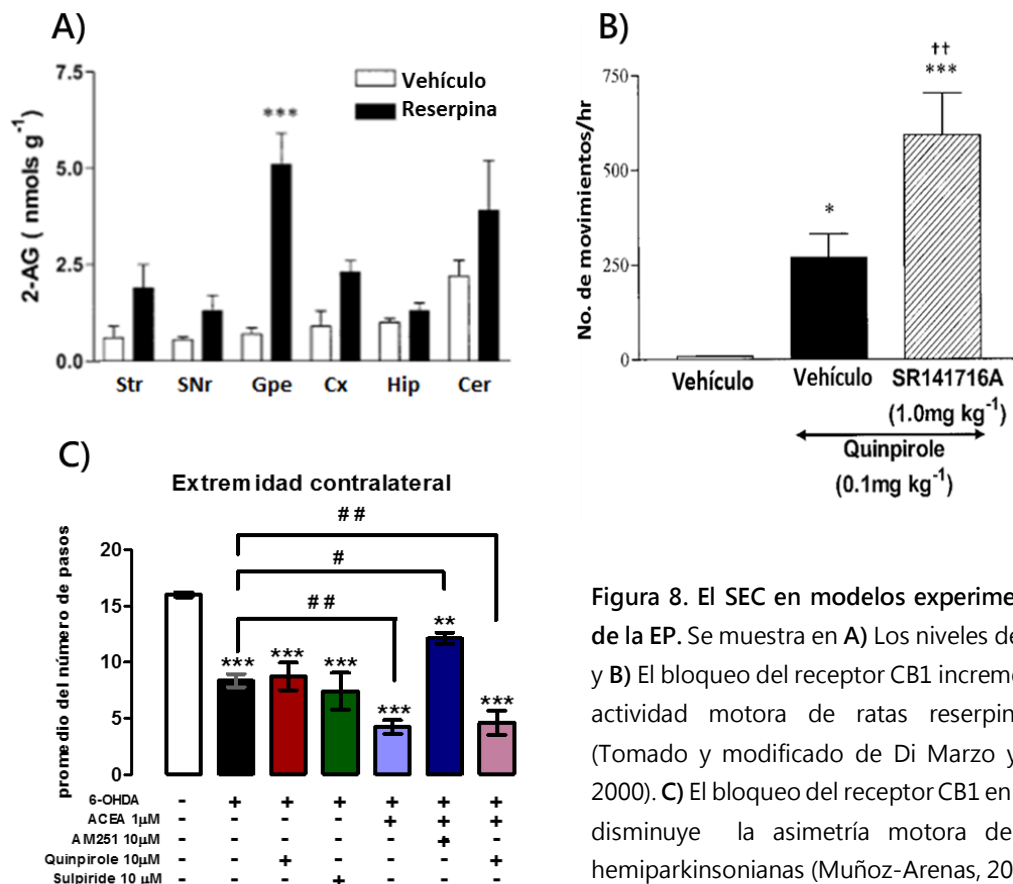


Figura 8. El SEC en modelos experimentales de la EP. Se muestra en A) Los niveles de 2-AG y B) El bloqueo del receptor CB1 incrementa la actividad motora de ratas reserpinizadas (Tomado y modificado de Di Marzo y cols., 2000). C) El bloqueo del receptor CB1 en el GPe disminuye la asimetría motora de ratas hemiparkinsonianas (Muñoz-Arenas, 2010).

1.5 La 6-OHDA como modelo de estudio de la enfermedad de Parkinson

El modelo de lesión unilateral con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) en la vía nigroestriatal se usa para desarrollar un modelo experimental de la EP, ya que esta molécula causa una degeneración progresiva y retrograda de las terminales neuronales y cuerpos celulares de las neuronas dopaminérgicas en la SNc. La 6-OHDA usa el mismo sistema de transporte que la DA para internalizarse a la neurona y así producir sus efectos tóxicos, los cuales se deben al incremento del estrés oxidativo en la célula, consecuencia de que esta neurotoxina produce un potente efecto inhibitorio sobre los complejos I y IV de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria (Glinka y cols., 1997), favoreciendo así la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que desencadenará en un déficit metabólico evitando que las neuronas puedan realizar sus funciones fisiológicas normales y en consecuencia mueran. Sin embargo, la 6-OHDA también incrementa la formación de ROS y quinonas mediante su autooxidación, atribuyendo a este evento como la principal causa que desencadena la muerte de las neuronas dopaminérgicas (Soo Lee y cols., 2006).

Estudios realizados en ratas lesionadas con 6-OHDA en el haz medial del cerebro han mostrado que puede ocasionar la pérdida mayor al 70% de las neuronas dopaminérgicas, y producir desordenes neuroquímicos y conductuales como la disminución de dopamina en el estriado ipsilateral, que causa una sensibilización de los receptores dopaminérgicos postsinápticos y dicho efecto se puede manifestar por la conducta de giro inducida con la administración de apomorfina, debido al desbalance dopaminérgico existente entre ambos estriados del cerebro (Deumens y cols., 2002).

2. JUSTIFICACIÓN

La característica fisiopatológica más reconocida de la enfermedad de Parkinson es la disminución de la concentración de dopamina en el circuito de los GB, debido a la muerte progresiva e irreversible de las neuronas dopaminérgicas de la SNc. Sin embargo, se ha demostrado que otros sistemas también están afectados, como el sistema endocanabinoide (Lastres Becker y cols., 2001), ya que en modelos animales de esta enfermedad se observan tanto cambios en la expresión de los receptores CB1 (Chaves Kirsten y cols., 2013) como un incremento en los niveles de endocannabinoides, el cual está acompañado de hipocinesia (Di Marzo y cols., 2000).

Diversos estudios han descrito un papel importante de los receptores CB1 en la modulación de la actividad motora (Romero y cols., 2002), debido a su abundante distribución en el SNC, principalmente en los GB. Además, se ha demostrado que el bloqueo de este receptor en el GPe, núcleo crucial que interviene en la modulación del funcionamiento de los GB, disminuye la asimetría motora de ratas hemiparkinsonianas (Muñoz-Arenas, 2010). Sin embargo, no hay estudios que describan si este receptor podría participar en la modulación de las habilidades motoras finas en los GB, las cuales se ven afectadas en pacientes con la enfermedad de Parkinson y que repercuten en su calidad de vida.

El estudio de la activación y bloqueo de los receptores CB1 sobre las habilidades motoras finas de ratas hemiparkinsonianas aportará mayor información sobre sus efectos en el circuito de los GB y podría servir como blanco de estudio para proponer nuevas terapéuticas farmacológicas en las enfermedades neurodegenerativas relacionadas con trastornos motores, como la Enfermedad de Parkinson.

3. HIPÓTESIS

La activación del receptor a cannabinoides CB1 en el Globo Pálido externo disminuye las habilidades motoras finas, mientras que su bloqueo las mejora en ratas hemiparkinsonianas.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

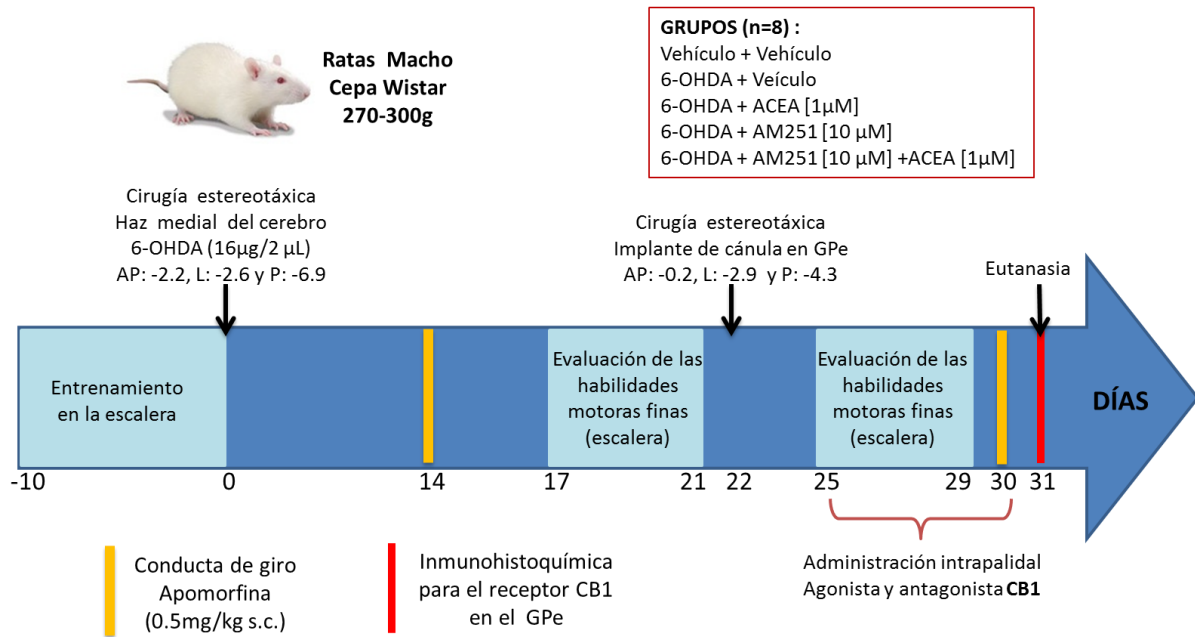
Evaluar los efectos de la activación y bloqueo del receptor CB1 en el Globo Pálido externo sobre las habilidades motoras finas de ratas hemiparkinsonianas.

4.2 Objetivos particulares

- I. Evaluar los efectos de la activación y bloqueo del receptor CB1 en el Globo Pálido externo sobre las habilidades motoras finas de ratas hemiparkinsonianas.
- II. Evaluar los efectos de la activación y bloqueo del receptor CB1 en el Globo Pálido externo sobre la asimetría motora de ratas hemiparkinsonianas.
- III. Evaluar los efectos de la activación y bloqueo del receptor CB1 sobre su expresión en el Globo Pálido externo de ratas hemiparkinsonianas.

5. METODOLOGÍA

5.1 Diagrama general de trabajo



5.2 Sujetos de experimentación

Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar ($n=40$) de 270 a 300g de peso, provenientes del Bioterio "Claude Bernard" de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Las ratas se mantuvieron en cajas de acrílico en el vivario del Laboratorio de Neurofarmacología, a temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, con un ciclo luz/obscuridad de 12 horas y libre acceso a agua y alimento, hasta llegar al peso requerido; todo en base a los protocolos de cuidado y manejo de animales de laboratorio del Bioterio de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y con fundamento en la NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio).

5.2 Estudio conductual en el modelo de la escalera

El modelo de la escalera fue propuesto por Montoya y cols., en 1991 como una herramienta para evaluar las habilidades motoras finas en rata. El modelo consiste de una caja de plexiglás transparente conformado por dos cámaras (Figura 9A). La primera consta de una cámara de 20 cm de largo por 10 cm de ancho y 10 cm de altura en donde el sujeto de experimentación es colocado. La segunda parte es una cámara angosta de 17 cm de largo por

6.5 cm de ancho y 10 cm de altura, además, esta cámara cuenta con una plataforma central de 11.5 cm de largo por 3 cm de ancho y 5 cm de altura, la cual impide el cruce entre ambas extremidades y también le sirve como soporte al sujeto. En la parte frontal de la cámara angosta se colocan un par de escaleras removibles con 6 escalones cada una (Figura 9B). Cada escalón mide 15 mm de largo por 10 mm de ancho y 5 mm de altura, y en cada uno de ellos se colocan 2 pastillas de alimento, las cuales deberán ser sujetadas y comidas por la rata utilizando las extremidades delanteras.

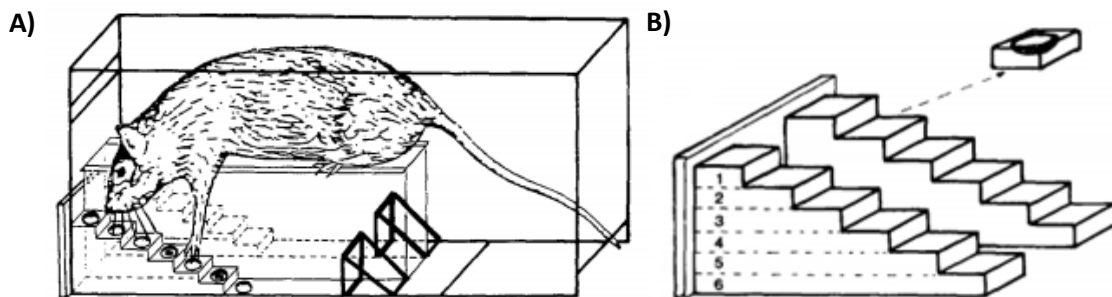


Figura 9. Modelo de la escalera. A) Esquema del modelo y acción de una rata en la prueba de la escalera. B) Esquema de las escaleras removibles en las que a cada escalón se le deposita el alimento para ser sujetado por los animales de experimentación (Montoya y cols., 1991).

5.2.1 Control de peso

Para que la prueba se realice con eficacia es necesario que los sujetos de experimentación tengan apetito y estén interesados en comer las pastillas de alimento, por lo que fueron sometidos a control de peso 10 días antes de comenzar con el entrenamiento y se mantuvo durante las evaluaciones, consistió en restringir el consumo diario de alimento de los animales para lograr que bajarán un 15% de su peso corporal con respecto a su peso inicial (Mendieta y cols., 2009). Por lo que, los sujetos experimentales se mantuvieron en cajas de acrílico individuales y su peso se registró diariamente.

5.2.2 Entrenamiento

Los sujetos de experimentación se entrenaron en el modelo de la escalera introduciéndolos durante 10 minutos diarios por 10 días, con el objetivo de habituar a los animales y de que aprendieran a sujetar e ingerir las pastillas de alimento localizadas en los escalones de la prueba conductual. Además, este entrenamiento nos permite determinar si las ratas tienen algún daño motor antes de someterlas al protocolo experimental, ya que se

cuantificaron el número de pastillas que ingirieron y solo las ratas que fueron capaces de comer al menos 10 pastillas de alimento con ambas extremidades, continuaron en el desarrollo experimental (Mendieta y cols., 2009).

5.3 Lesión con 6-OHDA en el haz medial del cerebro

Para localizar el haz medial del cerebro, que corresponde a la vía nigroestriatal donde los axones de las neuronas dopaminérgicas de la SNc proyectan hacia el estriado, se realizó la administración de azul de metileno al 1% mediante una microinyección de 2 μ L, tomando de referencia las coordenadas propuestas por Paxinos y Watson (1998) AP: -2.3, L: -2.7 con respecto a brema y P: -6.7 con respecto a la duramadre (Figura 10).

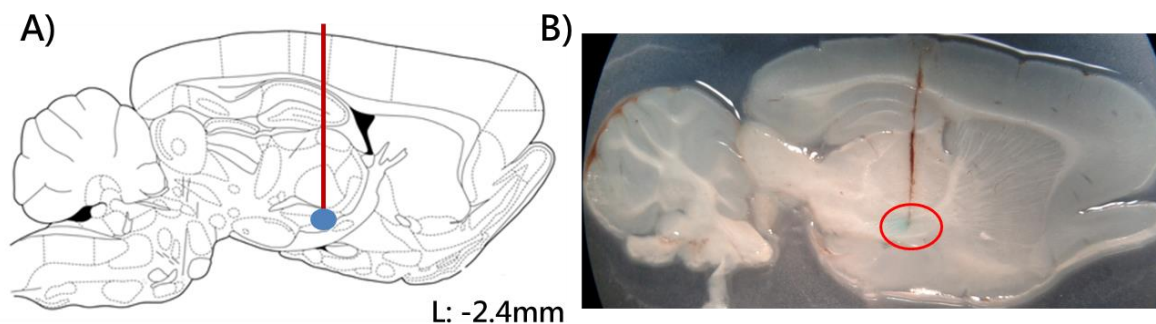


Figura 10. Localización del sitio de lesión. En A) se muestra el esquema representativo de las coordenadas del haz medial del cerebro de ratas de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson en 1998. En B) se muestra la trayectoria de la microinyección y difusión del azul de metileno en el círculo rojo.

Una vez que los sujetos experimentales fueron entrenados en el modelo de la escalera se sometieron a una cirugía estereotáxica, por lo que se anestesiaron con Ketamina (75 mg/Kg) y Xilacina (10 mg/Kg) por vía i.p. para posteriormente colocarlos en el aparato estereotáxico (Stolting, Co.) para pequeños roedores y se les realizó una microinyección unilateral en el haz medial derecho del cerebro con 6-OHDA (16 μ g/2 μ L) o Vehículo (2 μ L de ácido ascórbico al 0.02%). Después de la cirugía los sujetos se mantuvieron en observación y recuperación bajo los protocolos postoperatorios correspondientes.

5.4 Conducta de giro

Para saber si se reprodujo el modelo de hemiparkinsonismo en ratas se evaluó a los 14 días posteriores a la inyección unilateral de 6-OHDA el grado de lesión dopaminérgica, mediante la prueba de conducta de giro, propuesta por Ungerstedt y Arbuthnott en 1970, la cual permite

hacer una correlación entre el número de giros y la muerte neuronal dopaminérgica. Se administró 0.5 mg/kg de apomorfina por vía subcutánea y se evaluó durante 60 minutos a los sujetos de experimentación, se registraron el número de giros contralaterales que realizaron por minuto, durante 6 periodos de 10 minutos cada uno. Sólo se tomaron en cuenta para la siguiente fase del experimento a las ratas que lograron hacer 6 o más giros por minuto (Galván y cols., 2001). Esta prueba se realizó nuevamente al día 30 posterior a la lesión, para evaluar la progresión del daño dopaminérgico y determinar si el tratamiento con el agonista o antagonista del receptor CB1 modificó la conducta de giro de las ratas hemiparkinsonianas.

5.5 Evaluación de las habilidades motoras finas

El modelo de la escalera es utilizado para evaluar la ejecución del movimiento en las extremidades delanteras de las ratas de forma independiente, además, permite hacer una medición cuantitativa y cualitativa de las habilidades de alcanzar, sostener e ingerir las pastillas de alimento (Montoya y cols., 1991; Clarke y cols., 2007; Whishaw y cols., 1997).

Las habilidades motoras finas de los sujetos de experimentación se evaluaron dos veces durante el protocolo experimental, el primero comprendió de los días 17 a 21 posteriores a la lesión con 6-OHDA y el segundo de los días 25 a 29 igualmente posteriores a la lesión y con la administración intrapalidal del agonista y antagonista del receptor CB1. Para evaluar las habilidades motoras finas de los animales en ambos periodos, se sometieron nuevamente a la prueba de la escalera durante 10 minutos diariamente y los ensayos fueron videograbados para su análisis, considerando cuatro parámetros: (1) el número de pastillas comidas con cada extremidad ipsilateral y contralateral a la lesión; (2) el número de movimientos de pronar, considerado cuando los animales extiendan sus extremidades delanteras con la palma hacia abajo; (3) el número de movimientos de asir, considerado cuando los sujetos toman las pastillas de alimento y retraen la extremidad hacia su cuerpo; y por último (4) el número de movimientos de supinar, el cual es considerado cuando los animales giran la muñeca de la extremidad que tiene el alimento para llevárselo a la boca y comerlo (Clarke y cols., 2007; Mendieta y cols., 2009).

5.6 Implante de cánula en el GPe por cirugía estereotáxica

Posterior a que se demostró el grado de lesión dopaminérgica y se evaluaron las habilidades motoras finas, al día 22 posterior a la lesión, los sujetos fueron anestesiados con Ketamina (75 mg/Kg) y Xilacina (10 mg/Kg) y se les realizó una segunda cirugía estereotáxica

para implantar una cánula de acero inoxidable en el GPe y tener una vía de administración local, lo cual permitió poder evaluar la acción de los receptores CB1 sobre las habilidades motoras finas.

Para realizar el implante de la cánula en el GPe derecho se utilizaron las coordenadas propuestas por el atlas de Paxinos y Watson (1998), AP: -0.4, L: -3.1 con respecto a Bregma y P: -3.3 con respecto a la duramadre. Las cánulas se fijaron con cemento acrílico dental y con el apoyo de un tornillo de acero inoxidable al lado de la cánula. Posterior a la cirugía se realizaron los cuidados postoperatorios para comenzar con las evaluaciones conductuales tres días después a la implantación de la cánula.

5.7 Preparación y administración de los fármacos en el Globo Pálido externo

El agonista del receptor CB1 araquidonil-2-cloroetilamida (ACEA) y el antagonista del receptor CB1 N-(piperidin-1-il)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxiamida hidroclicídica (AM251), fueron diluidos en dimetilsulfoxido (DMSO) al 0.01% hasta llevarlos a las concentraciones de 1 μ M y 10 μ M respectivamente.

El día de las evaluaciones conductuales a los sujetos de experimentación se les administró intrapalidalmente 1 μ L del agonista ACEA (1 μ M), AM251 (10 μ M) o su combinación, mediante una microinyección con una bomba de infusión continua (Harvard) conectada a una microjeringa Hamilton (10 μ L), a una velocidad de 0.25 μ L/min, una vez transcurrido el tiempo de administración la microjeringa permaneció un minuto más para asegurar la perfusión del fármaco y posteriormente los sujetos fueron sometidos a las evaluaciones conductuales.

5.8 Inmunohistoquímica para el receptor CB1

Los sujetos de experimentación evaluados se anestesiaron al día 31 post-lesión con Ketamina (75 mg/Kg) y Xilacina (10 mg/Kg) para posteriormente someterlos a una perfusión intracardiaca. La perfusión se realizó con buffer de fosfatos 0.1 M (PBS pH=7.4) y paraformaldehído al 4% con el propósito de extraer el cerebro sin células sanguíneas y fijar el tejido para evitar la degradación celular. Los cerebros se mantuvieron en paraformaldehído al 4% durante 7 días, posteriormente fueron incubados en una solución de sacarosa al 7% durante 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, los cerebros fueron colocados y cortados en un vibratomo (Leica VT1000S) para obtener cortes coronales de GPe con un espesor de 30 μ m.

Para determinar la presencia del receptor CB1 se realizó una técnica de inmunofluorescencia. Los cortes se colocaron en placas de flotación y se lavaron con buffer de fosfatos y Tritón al 0.2 % (PBS-T) a un pH de 7.4 durante 10 minutos tres veces consecutivas. Posteriormente, los tejidos se incubaron con una solución de albúmina sérica de bovino (BSA) libre de IgG al 2% en PBS-T, durante dos horas. Al término, los cortes se lavaron para después ser incubados con el anticuerpo primario anti-CB1 policlonal de conejo (Cayman) a una dilución 1:250, durante toda la noche a una temperatura de 4°C.

Una vez que las muestras se incubaron con el anticuerpo primario fueron lavadas con PBS-T a un pH de 7.4 durante 10 minutos tres veces consecutivas y después se colocaron sobre portaobjetos gelatinizados (gretina al 3%). Posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo Rodamina (TRITC, mouse, anti-rabbit 1/100) por 2 horas a temperatura ambiente y en obscuridad. Se lavaron 3 veces con PBS y finalmente se montaron con Vecta-Shield conjugado con DAPI (4, 6-diamino-2-fenilindol).

La captura de fotos para el GPe se realizaron a 40X, por medio de un microscopio de fluorescencia Leica DM1000 LED con cámara integrada y el software de captura CapturePro para ProgRes® versión 2.8.8.

Posteriormente a la toma de las fotomicrografías se realizó el análisis densitométrico para evaluar si la activación o bloqueo farmacológico del receptor CB1 provoca un cambio en la expresión de dicha proteína en el GPe de ratas hemiparkinsonianas, para lo cual se utilizó el programa Image J, donde la inmunorreactividad al RCB1 (marca roja) se representa como el % de área teñida respecto al área total de la fotomicrografía que se considera como el 100%.

5.9 Tinción de Nissl modificada

Para evidenciar el sitio de implantación de las cánulas en el Globo Pálido externo, se tomaron cortes coronales de 30 μm y se colocaron sobre portaobjetos gelatinizados. Posteriormente fueron teñidos con azul de cresilo al 1% durante 30 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de tinción, los cortes se lavaron con agua destilada durante 3 minutos, se deshidrataron con etanol y xileno. Por último se montaron con resina sintética y protegidos con un cubreobjetos.

6. RESULTADOS

6.1 Sitio de Implantación de la cánula en el Globo Pálido Externo

Al término de las pruebas conductuales, a los sujetos de experimentación se les practicó eutanasia, se obtuvieron sus cerebros para realizar cortes coronales y verificar la posición del implante de las cánulas en el GPe derecho. Se realizó la tinción de Nissl modificada para evidenciar la trayectoria de la cánula. Únicamente las ratas con la cánula en el sitio correcto fueron consideradas en los resultados y en el análisis estadístico del presente trabajo.

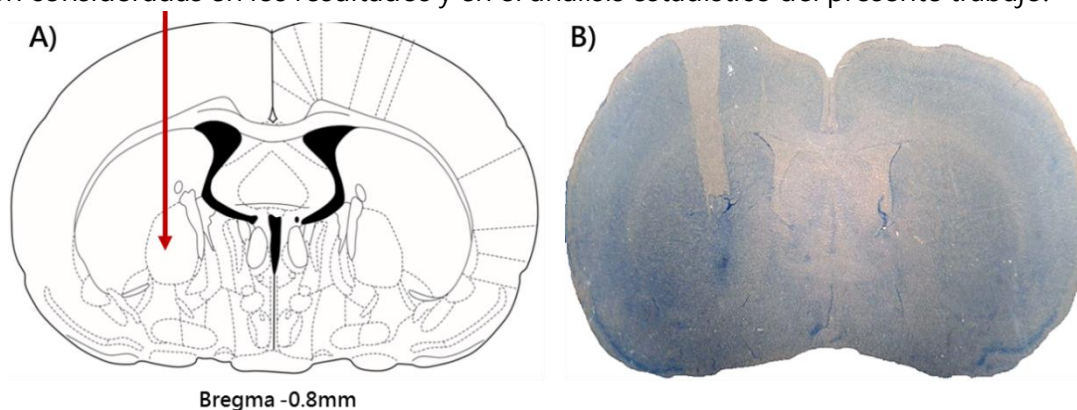


Figura 11. Localización de la cánula en el Globo Pálido externo de rata. **A)** Representación esquemática de un corte coronal de cerebro de rata Bregma: -0.8mm (Paxinos y Watson, 1998). **B)** Fotografía de un corte coronal (30 µm) de cerebro de rata que muestra la trayectoria de la cánula al GPe (Tinción de Nissl modificada).

6.2 Efecto de la activación y bloqueo del receptor CB1 en el Globo Pálido externo sobre las habilidades motoras finas de ratas hemiparkinsonianas

Los sujetos de experimentación se entrenaron en el modelo de la escalera durante 10 días y posteriormente se evaluaron sus habilidades motoras finas en dicha prueba durante dos periodos de 5 días cada uno, el primero fue a los 17 post-lesión para evaluar el efecto de la lesión dopaminérgica y, el segundo fue a los 25 días post-lesión, durante el cual se evaluó el efecto de la administración intrapalidal del agonista y antagonista del receptor CB1. Se registró el número de pastillas que comían con la extremidad ipsilateral y contralateral a la lesión durante 10 minutos.

En la Figura 12A se muestra que el número de pastillas comidas con la extremidad ipsilateral a la lesión no tiene ninguna diferencia significativa entre los animales lesionados con 6-OHDA con respecto al grupo vehículo en la evaluación post-lesión, ni de los grupos

lesionados con la administración intrapalidal de los fármacos respecto al grupo vehículo en la evaluación del tratamiento.

En cuanto a la extremidad contralateral a la lesión (Figura 12B), durante la evaluación en el periodo de Post-lesión se observa un menor número de pastillas comidas por el grupo 6-OHDA (3.33 pastillas) con respecto al grupo vehículo (8.80 pastillas), que representa un decremento del 62.15% en las habilidades motoras finas. En la evaluación durante el Tratamiento todos los grupos lesionados con 6-OHDA muestran un menor número de pastillas comidas y tienen una diferencia significativa ($***p < 0.001$) en comparación al grupo vehículo. La activación del receptor CB1 en el GPe con la administración del agonista ACEA [1 μ M] no muestra ninguna diferencia significativa en relación al grupo únicamente lesionado con 6-OHDA+Vehículo. Sin embargo, el grupo tratado con el antagonista AM251 [10 μ M] más el agonista ACEA [1 μ M] muestra un número menor de pastillas comidas con diferencia significativa durante el primer día de tratamiento con respecto al grupo 6-OHDA+Vehículo ($\#p < 0.05$) y, durante los dos primeros días de tratamiento con respecto al grupo 6-OHDA+ACEA ($++p < 0.01$), además de ser el grupo con el menor porcentaje de pastillas comidas (5.81%) con respecto al grupo Vehículo. Los datos del promedio de número de pastillas comidas con la extremidad ipsilateral y contralateral durante el periodo del Tratamiento se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Número de pastillas comidas con las extremidades superiores durante el tratamiento en el modelo de la escalera

Grupos	Extremidad Ipsilateral			Extremidad Contralateral		
	Promedio	\pm ESM	%	Promedio	\pm ESM	%
Vehículo + Vehículo	10.025	0.197	100	8.600	0.267	100
6-OHDA+ Vehículo	8.850	0.259	88.279	1.750	0.337	20.349
6-OHDA +ACEA	9.600	0.242	95.761	2.775	0.241	32.267
6-OHDA +AM251 + ACEA	8.700	0.253	86.783	0.500	0.134	5.814
6-OHDA +AM251	9.275	0.263	92.519	1.228	0.290	14.279

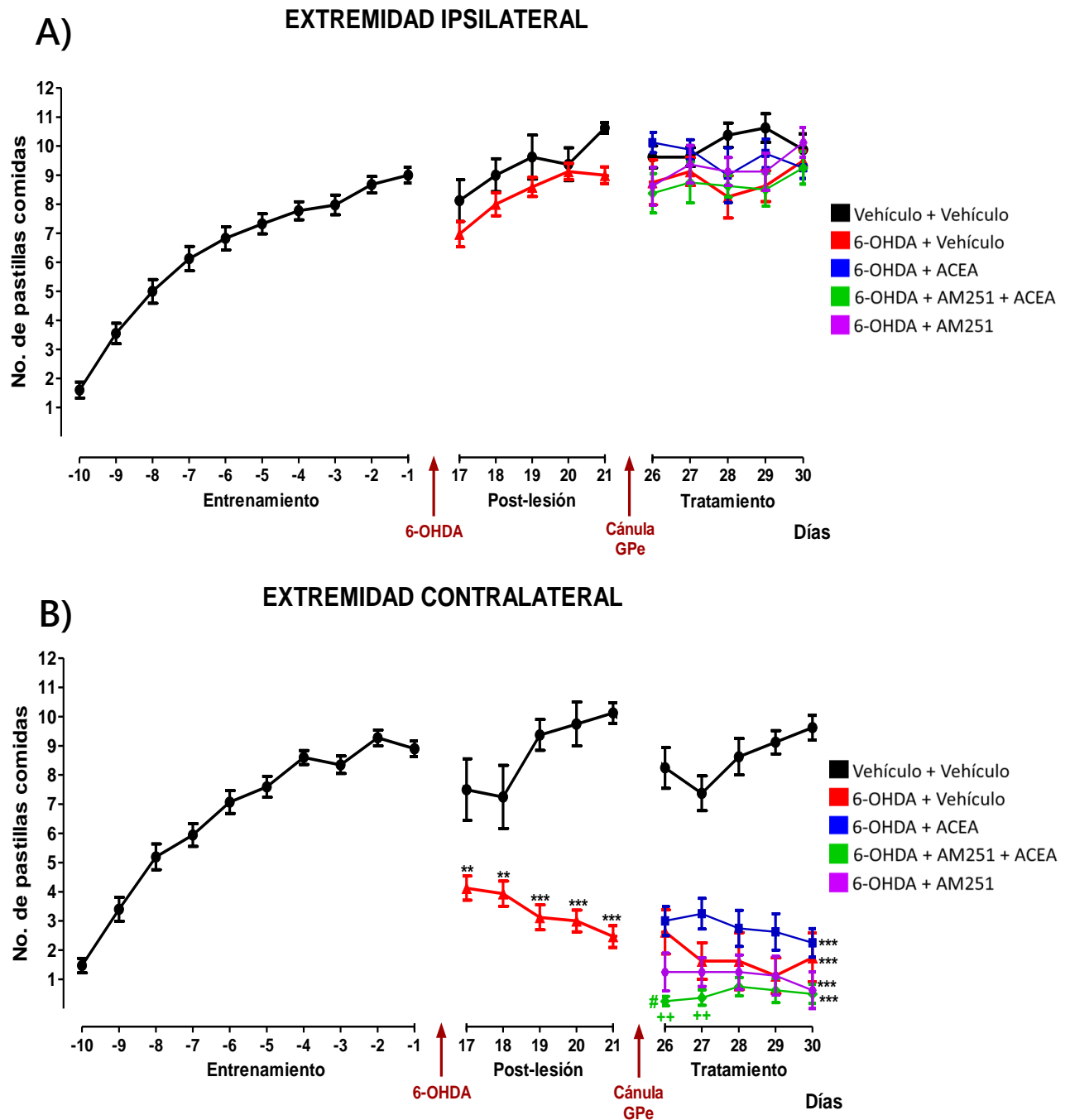


Figura 12. El bloqueo del receptor CB1 disminuye las habilidades motoras finas de ratas hemiparkinsonianas. Cada punto muestra la media (\pm ESM) del número de pastillas comidas en A) la extremidad ipsilateral y B) la extremidad contralateral durante 10 minutos con respecto al día de evaluación. Se realizó una ANOVA de dos vías con un post-test Bonferroni y un nivel de significancia * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$. * vs Vehículo, # vs 6-OHDA+Vehículo y + vs 6-OHDA+ACEA

6.3 Efecto de la activación y bloqueo del receptor CB1 en el Globo Pálido externo sobre los movimientos finos de ratas hemiparkinsonianas.

Durante la prueba de la escalera cada una de las evaluaciones fueron videograbadas y posteriormente analizadas para determinar el número de movimientos finos realizados por cada sujeto experimental de todos los grupos. Los movimientos que se cuantificaron fueron: pronar, asir y supinar, durante los 10 minutos de cada día de evaluación.

La cuantificación de los movimientos de pronar (Figura 13) realizados por los sujetos experimentales con las extremidades superiores se muestran en la Figura 14, no se observa ninguna diferencia en el número de movimientos realizados con la extremidad ipsilateral a la lesión en cada uno de los grupos (Figura 14A). Con respecto a la extremidad contralateral durante la evaluación post-lesión, el grupo 6-OHDA (11.47 movimientos) tiene un menor número de movimientos realizados con respecto al grupo vehículo (24.76 movimientos), por lo que tuvo un decremento del 53.66%, y durante la evaluación con el tratamiento todos los grupos lesionados con 6-OHDA muestran una diferencia significativa ($***p < 0.001$) con respecto al control, pero ninguna diferencia entre los grupos lesionados con los diferentes tratamientos farmacológicos (Figura 14B). Los datos del promedio de número de movimientos de pronar con las extremidades superiores durante el periodo del Tratamiento se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Número de movimientos de pronar con las extremidades superiores durante el tratamiento en el modelo de la escalera

Grupos	Extremidad Ipsilateral			Extremidad Contralateral		
	Promedio	±ESM	%	Promedio	±ESM	%
Vehículo + Vehículo	21.125	0.990	100	21.850	1.196	100
6-OHDA+ Vehículo	20.675	0.657	97.870	7.675	0.707	35.126
6-OHDA +ACEA	17.150	0.679	81.183	7.050	0.677	32.265
6-OHDA +AM251 + ACEA	17.850	0.601	84.497	4.125	0.544	18.879
6-OHDA +AM251	18.550	0.750	87.811	6.050	0.700	27.689

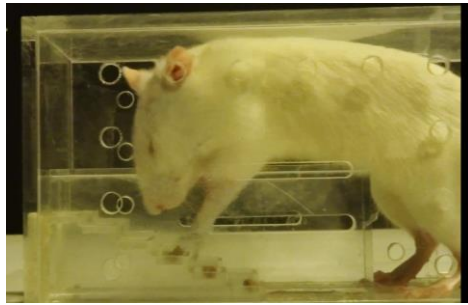


Figura 13. Movimiento pronar. Es la acción que realizan los animales de extender su extremidad delantera con la palma dirigida hacia abajo.

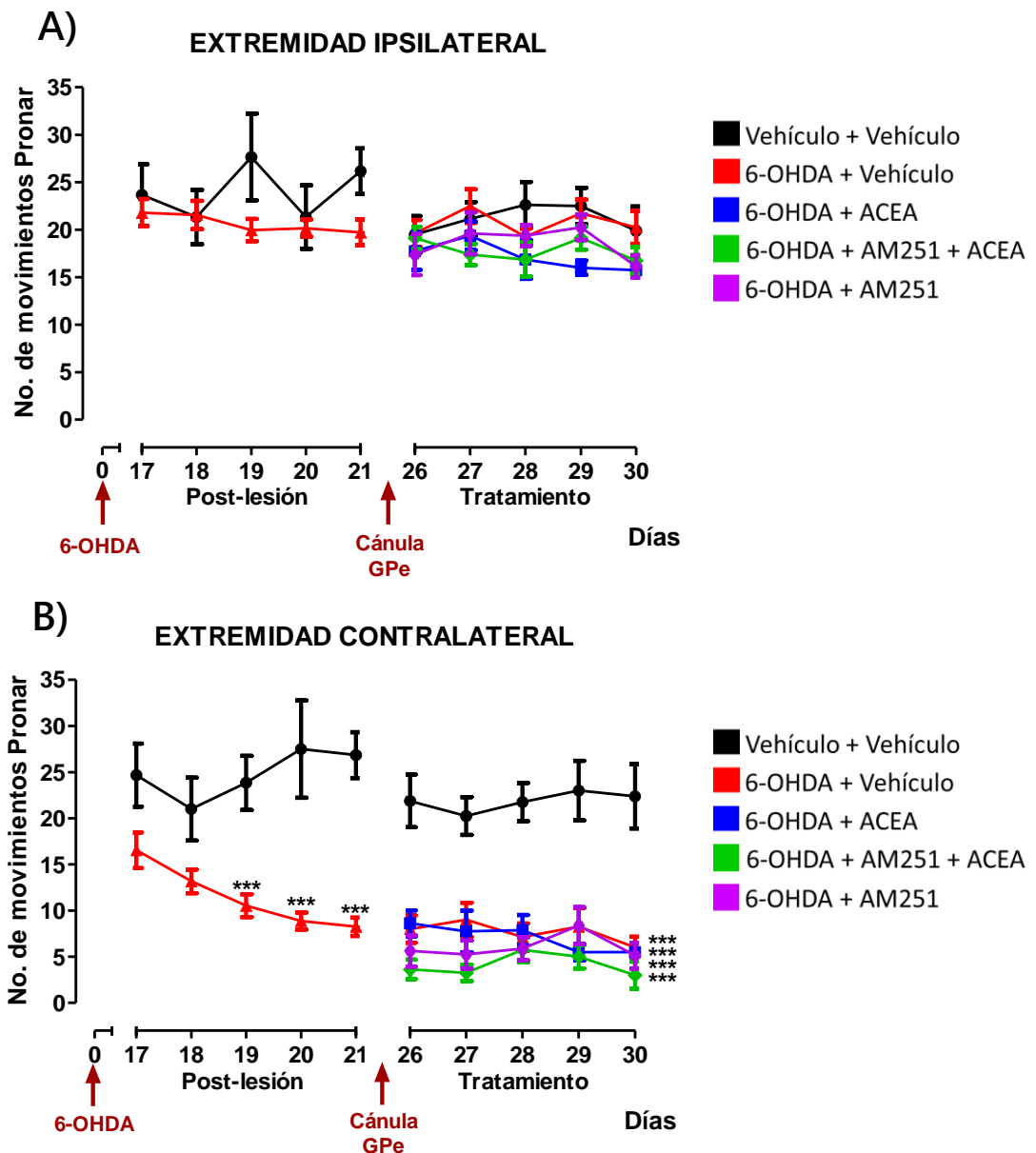


Figura 14. La activación y el bloqueo del receptor CB1 no modifican el número de movimientos de pronar de ratas hemiparkinsonianas. Cada punto muestra la media (\pm ESM) del número de movimientos de pronar en A) la extremidad ipsilateral y B) la extremidad contralateral durante 10 minutos con respecto al día de evaluación. Se realizó una ANOVA de dos vías con un post-test Bonferroni y un nivel de significancia $***p < 0.001$ vs Vehículo.

El número de movimientos de asir (Figura 15) realizados por los sujetos experimentales con la extremidad ipsilateral a la lesión no muestra ninguna diferencia en cada uno de los grupos, tanto en la evaluación post-lesión como en la evaluación con el tratamiento farmacológico (Figura 16A). Con respecto a la extremidad contralateral durante la evaluación post-lesión, el grupo 6-OHDA (8.53 movimientos) realizó un menor número de movimientos con respecto al grupo vehículo (3.68 movimientos), por lo que tuvo un decremento del 56.83%. Durante la evaluación con el tratamiento todos los grupos lesionados con 6-OHDA muestran una diferencia significativa ($***p < 0.001$) con respecto al grupo Vehículo. La activación del receptor CB1 en el GPe con la administración del agonista ACEA [1 μ M] no muestra ninguna diferencia significativa en relación al grupo únicamente lesionado con 6-OHDA+Vehículo. Sin embargo, el grupo tratado con el antagonista AM251 [10 μ M] más el agonista ACEA [1 μ M] muestra un número menor de movimientos asir durante los dos primeros días de tratamiento con respecto al grupo 6-OHDA+ACEA ($\#p < 0.05$) y, el grupo tratado únicamente con el antagonista AM251 también presenta un número menor de movimientos de asir con respecto al grupo 6-OHDA+ACEA durante el segundo día de tratamiento ($\#p < 0.05$). Además, ambos grupos tratados con el AM251 son los que presentaron el menor porcentaje del número de movimientos asir realizados con un 10.41% y 13.98% respectivamente con respecto al grupo Vehículo (100%) (Figura 16B). Los datos del promedio de número de movimientos de asir con las extremidades superiores durante el periodo del Tratamiento se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Número de movimientos de asir con las extremidades superiores durante el tratamiento en el modelo de la escalera

Grupos	Extremidad Ipsilateral			Extremidad Contralateral		
	Promedio	\pm ESM	%	Promedio	\pm ESM	%
Vehículo + Vehículo	9.475	0.258	100	8.400	0.276	100
6-OHDA+ Vehículo	8.925	0.282	94.195	1.925	0.334	22.917
6-OHDA +ACEA	9.950	0.441	105.013	2.800	0.248	33.333
6-OHDA +AM251 + ACEA	8.075	0.442	85.224	0.875	0.183	10.417
6-OHDA +AM251	8.800	0.270	92.876	1.175	0.272	13.988

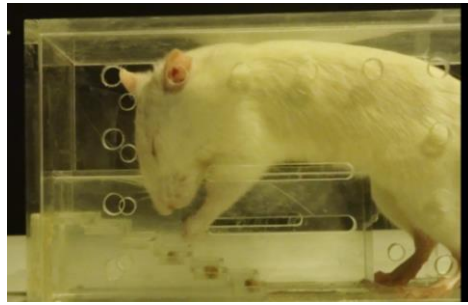


Figura 15. Movimiento asir. Es cuando los animales toman la pastilla de alimento y retraen la extremidad hacia su cuerpo.

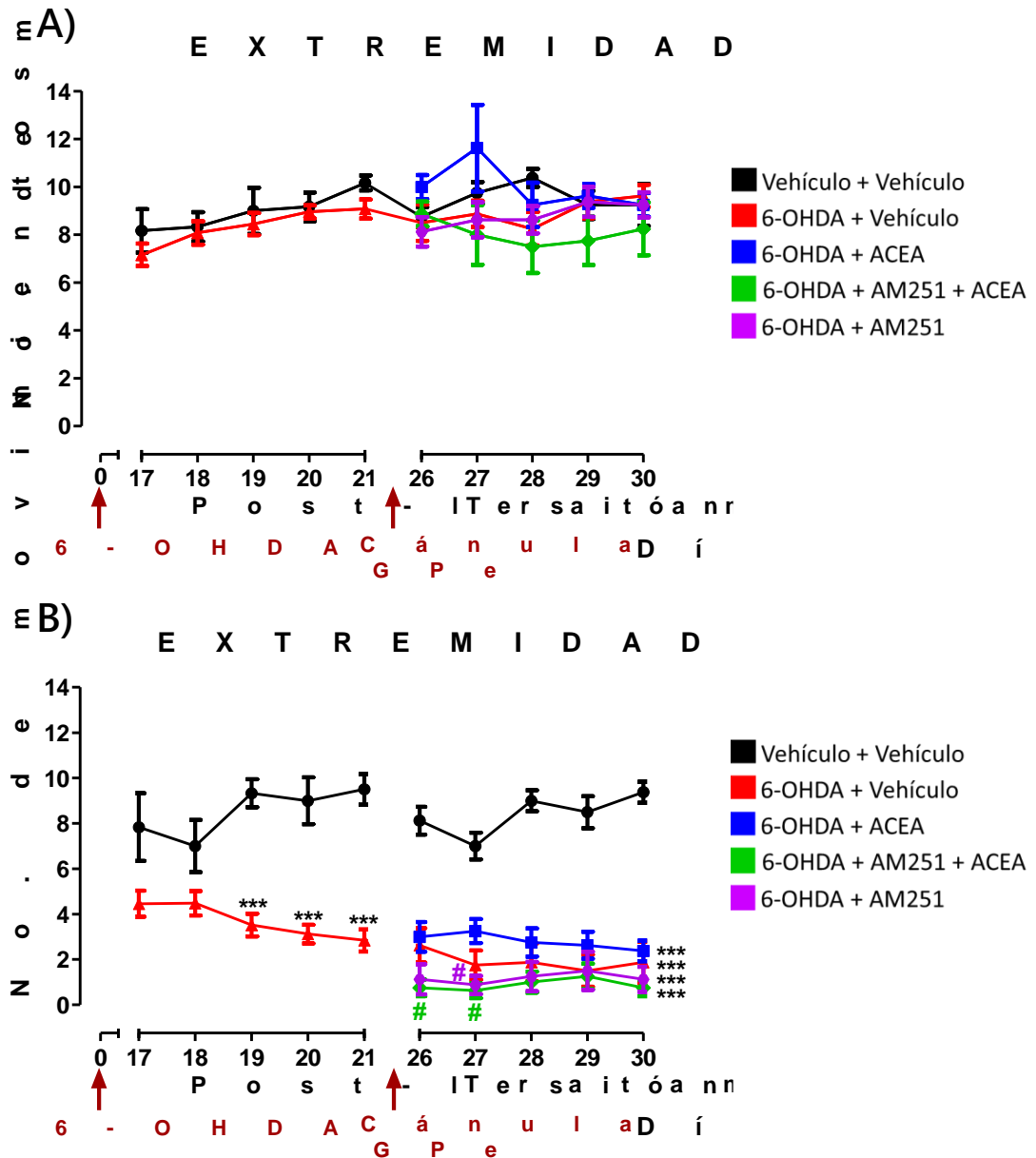


Figura 16. El bloqueo del receptor CB1 disminuye el número de movimientos asir de ratas hemiparkinsonianas. Cada punto muestra la media (\pm ESM) del número de movimientos de asir en A) la extremidad ipsilateral y B) la extremidad contralateral durante 10 minutos con respecto al día de evaluación. Se realizó una ANOVA de dos vías con un post-test Bonferroni y un nivel de significancia $***p < 0.001$ vs Vehículo y $\#p < 0.05$ vs 6-OHDA+ACEA.

El número de movimientos de supinar (Figura 17) realizados por los sujetos experimentales con la extremidad ipsilateral a la lesión no muestra ninguna diferencia en cada uno de los grupos, tanto en la evaluación post-lesión como en la evaluación con el tratamiento farmacológico (Figura 18A). Con respecto a la extremidad contralateral durante la evaluación post-lesión, el grupo 6-OHDA (8.53 movimientos) realizó un menor número de movimientos con respecto al grupo vehículo (3.68 movimientos), por lo que tuvo un decremento del 56.86%. Durante la evaluación con el tratamiento todos los grupos lesionados con 6-OHDA muestran una diferencia significativa ($***p < 0.001$) con respecto al grupo vehículo. La activación del receptor CB1 en el GPe con ACEA no muestra ninguna diferencia significativa en relación al grupo únicamente lesionado con 6-OHDA+Vehículo. Sin embargo, el grupo tratado con el antagonista AM251 [10 μ M] más el agonista ACEA [1 μ M] muestra un número menor de movimientos supinar durante los dos primeros días de tratamiento con respecto al grupo 6-OHDA+ACEA ($\#p < 0.05$, $##p < 0.01$) y, el grupo tratado únicamente con el antagonista AM251 también presenta un número menor de movimientos de asir con respecto al grupo 6-OHDA+ACEA durante el segundo día de tratamiento ($\#p < 0.05$). Además, ambos grupos tratados con el AM251 son los que presentaron el menor porcentaje del número de movimientos supinar realizados con un 6.60% y 12.61% respectivamente con respecto al grupo Vehículo (100%) (Figura 18B). Los datos del promedio de número de movimientos de supinar con las extremidades superiores durante el periodo del Tratamiento se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Número de movimientos de supinar con las extremidades superiores durante el tratamiento en el modelo de la escalera

Grupos	Extremidad Ipsilateral			Extremidad Contralateral		
	Promedio	ESM	%	Promedio	ESM	%
Vehículo + Vehículo	9.475	0.258	100	8.325	0.291	100
6-OHDA+ Vehículo	8.475	0.403	89.446	1.775	0.334	21.321
6-OHDA +ACEA	9.950	0.441	105.013	2.800	0.248	33.634
6-OHDA +AM251 + ACEA	8.675	0.224	91.557	0.550	0.151	6.607
6-OHDA +AM251	8.675	0.268	91.557	1.050	0.272	12.613

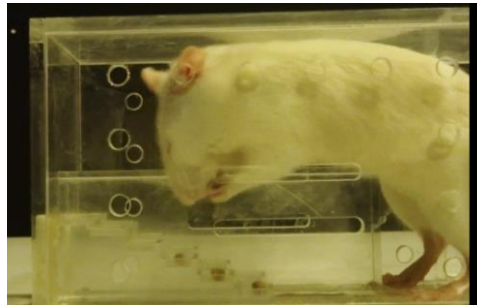


Figura 17. Movimiento supinar. Es cuando los animales giran la muñeca de la extremidad que tiene el alimento para llevárselo a la boca y comerlo.

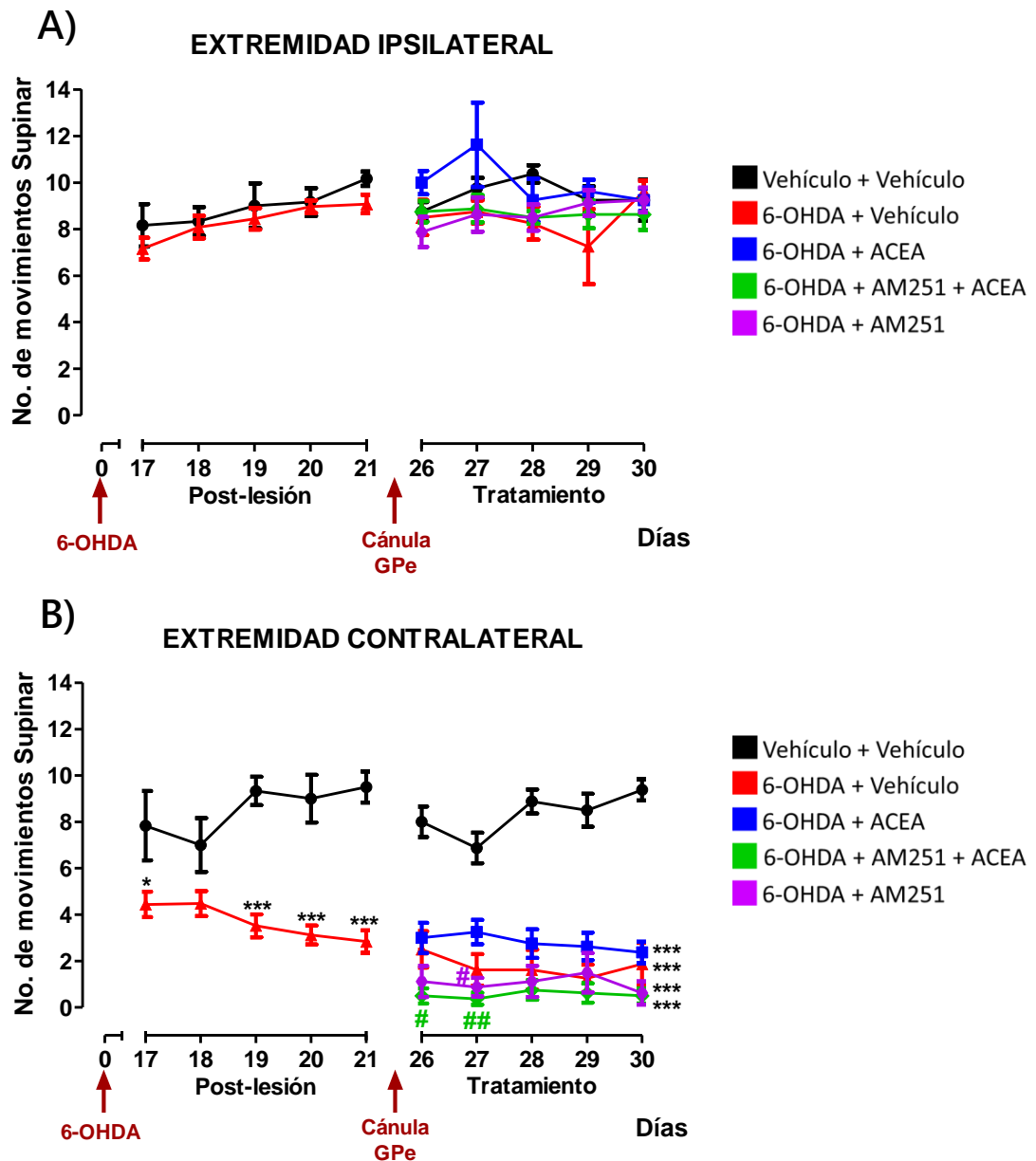


Figura 18. El bloqueo del receptor CB1 disminuye el número de movimientos supinar de ratas hemiparkinsonianas. Cada punto muestra la media (\pm ESM) del número de movimientos de supinar en A) la extremidad ipsilateral y B) la extremidad contralateral durante 10 minutos con respecto al día de evaluación. Se realizó una ANOVA de dos vías con un post-test Bonferroni y un nivel de significancia *** $p < 0.001$ vs Vehículo y # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs 6-OHDA+ACEA.

6.4 Efecto de la activación y bloqueo del receptor CB1 en el Globo Pálido externo sobre la conducta de giro de ratas hemiparkinsonianas

Posterior a la inyección con 6-OHDA en el haz medial del cerebro de los sujetos de experimentación, se evaluó el grado de lesión dopaminérgica 14 días posteriores a la lesión mediante la conducta de giro inducida con apomorfina (0.5 mg/kg, sc.), tomando esta prueba como un criterio de inclusión para las evaluaciones posteriores, por lo que sólo las ratas que llegaron a realizar 6 o más giros contralaterales por minuto durante un total de 60 minutos fueron incluidas en las posteriores evaluaciones conductuales.

Después de la evaluación de las habilidades motoras finas en la escalera con los diferentes tratamientos farmacológicos, al día 30 post-lesión se realizó una segunda evaluación en la prueba de conducta de giro (apomorfina 0.5 mg/Kg) para evaluar el efecto de la activación y bloqueo de los receptores CB1 sobre la asimetría motora. La activación del receptor CB1 con ACEA [1 µM] presentó un promedio total de 344 giros (98.79 %) durante 60 minutos. Por otro lado la administración intrapalidal del antagonista AM251 [10 µM] más el agonista ACEA [1 µM] del receptor CB1 incrementó el número de giros con un 113.7 % (397 giros), y la administración únicamente del antagonista AM251 [10 µM] presentó menor número de giros con un 86 % (300.5 giros). Sin embargo, ninguno de los grupos con los diferentes tratamientos farmacológicos presentó diferencia significativa con respecto al grupo únicamente lesionado con 6-OHDA+Vehículo que realizó en promedio un total de 349 giros contralaterales (100 %).

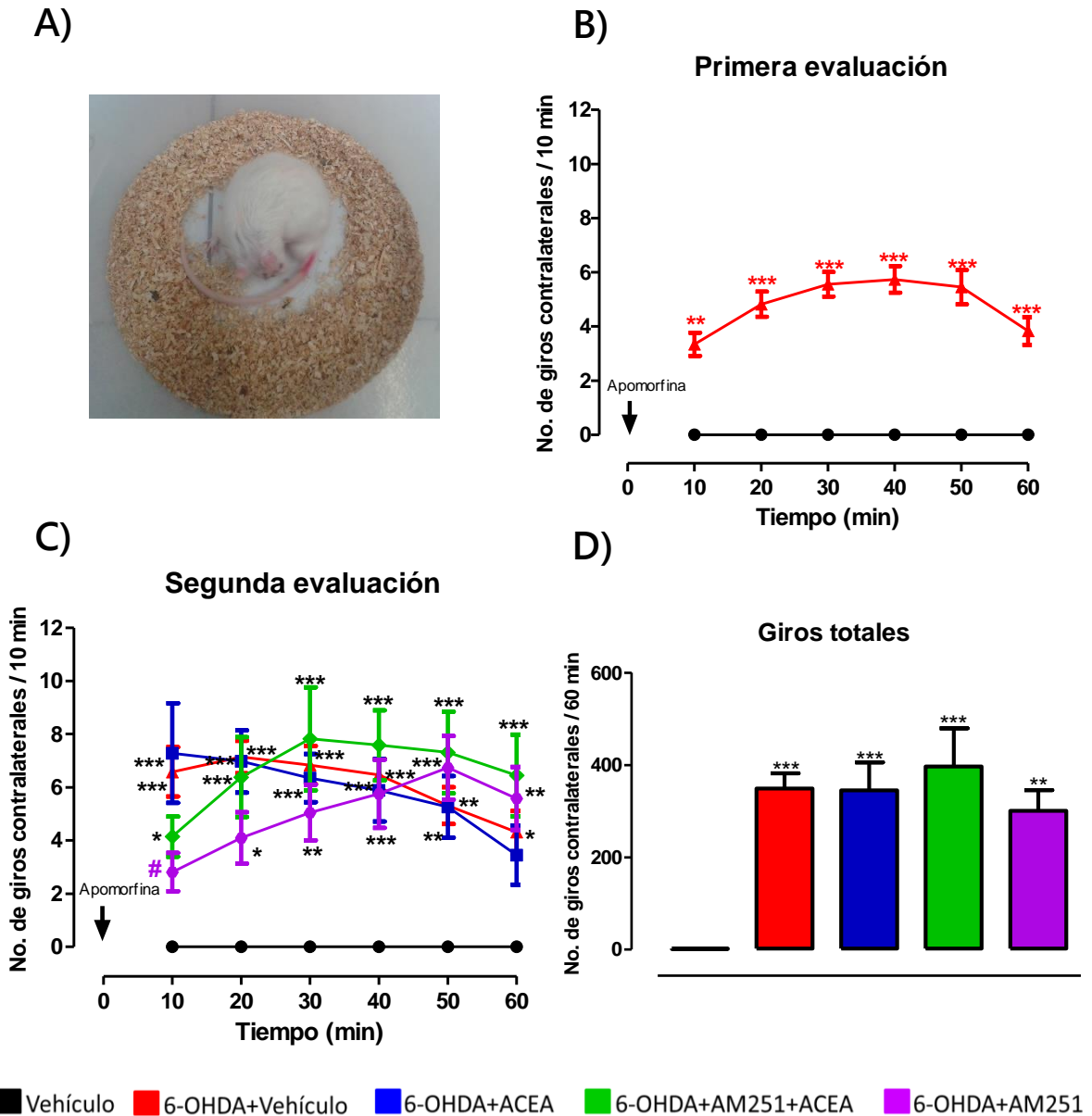


Figura 19. La activación y el bloqueo del receptor CB1 no disminuyen la conducta de giro de ratas hemiparkinsonianas. A) Fotografía de una rata durante la prueba de conducta de giro. Cada punto muestra la media (\pm ESM) del número de giros contralaterales por minuto en B) la primera evaluación (Vehículo $n=8$, 6-OHDA $n=32$) y C) la segunda evaluación de la conducta de giro inducida por apomorfina (0.5mg/Kg, sc.). Se realizó una ANOVA de dos vías con un post-test Bonferroni y un nivel de significancia $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$. * vs Vehículo, # vs 6-OHDA+ACEA. D) Número de giros totales (\pm ESM) durante 60 minutos en la segunda evaluación de la conducta de giro. Se realizó una ANOVA de una vía con un post-test Bonferroni y un nivel de significancia $**p<0.01$, $***p<0.001$ vs Vehículo.

6.5 Efecto de la activación y bloqueo del receptor CB1 sobre su expresión en el Globo Pálido externo de ratas hemiparkinsonianas

Con la finalidad de evaluar el efecto de la activación y bloqueo del receptor CB1 sobre su expresión en el GPe de ratas hemiparkinsonianas se realizó la inmunofluorescencia contra la proteína de dicho receptor para cada grupo experimental tanto del hemisferio ipsilateral a la lesión (Figura 20) como del hemisferio contralateral a la lesión (Figura 21). Se realizó un análisis densitométrico y la inmunorreactividad al receptor CB1 se muestra como el porcentaje de área teñida (Figura 22). Los resultados muestran que la lesión con 6-OHDA disminuye la expresión del receptor CB1 en el GPe ipsilateral a la lesión en un 49% respecto a su lado contralateral y un 43.53% en relación al lado ipsilateral del grupo Vehículo+Vehículo ($+++p<0.001$ y $**p<0.01$ respectivamente). Por otro lado, la administración intrapalidal del agonista ACEA [1 μ M] no muestra cambios significativos de la expresión del receptor CB1 en el GPe ipsilateral, sin embargo, únicamente el GPe contralateral muestra una diferencia significativa con respecto al GPe contralateral del grupo Vehículo (44.38 %, $***p<0.001$) y del grupo 6-OHDA+Vehículo (39.47 %, $+++p<0.001$). En relación al grupo con la administración del antagonista AM251 [10 μ M] más el agonista ACEA [1 μ M] tampoco muestra cambios en la expresión del receptor CB1 en el GPe ipsilateral, pero si muestra una menor expresión el GPe contralateral (55.07 %, $+++p<0.01$) respecto al GPe contralateral del grupo 6-OHDA+Vehículo y del GPe contralateral del grupo Vehículo+Vehículo (61.93 %, $***p<0.01$). El bloqueo del receptor CB1 con la sola administración del antagonista AM251 [10 μ M] presenta una mayor inmunorreactividad del GPe ipsilateral (171.41 %) en relación al GPe ipsilateral del grupo 6-OHDA+Vehículo ($+p<0.05$), sin embargo, no presenta ninguna diferencia significativa con el GPe contralateral.

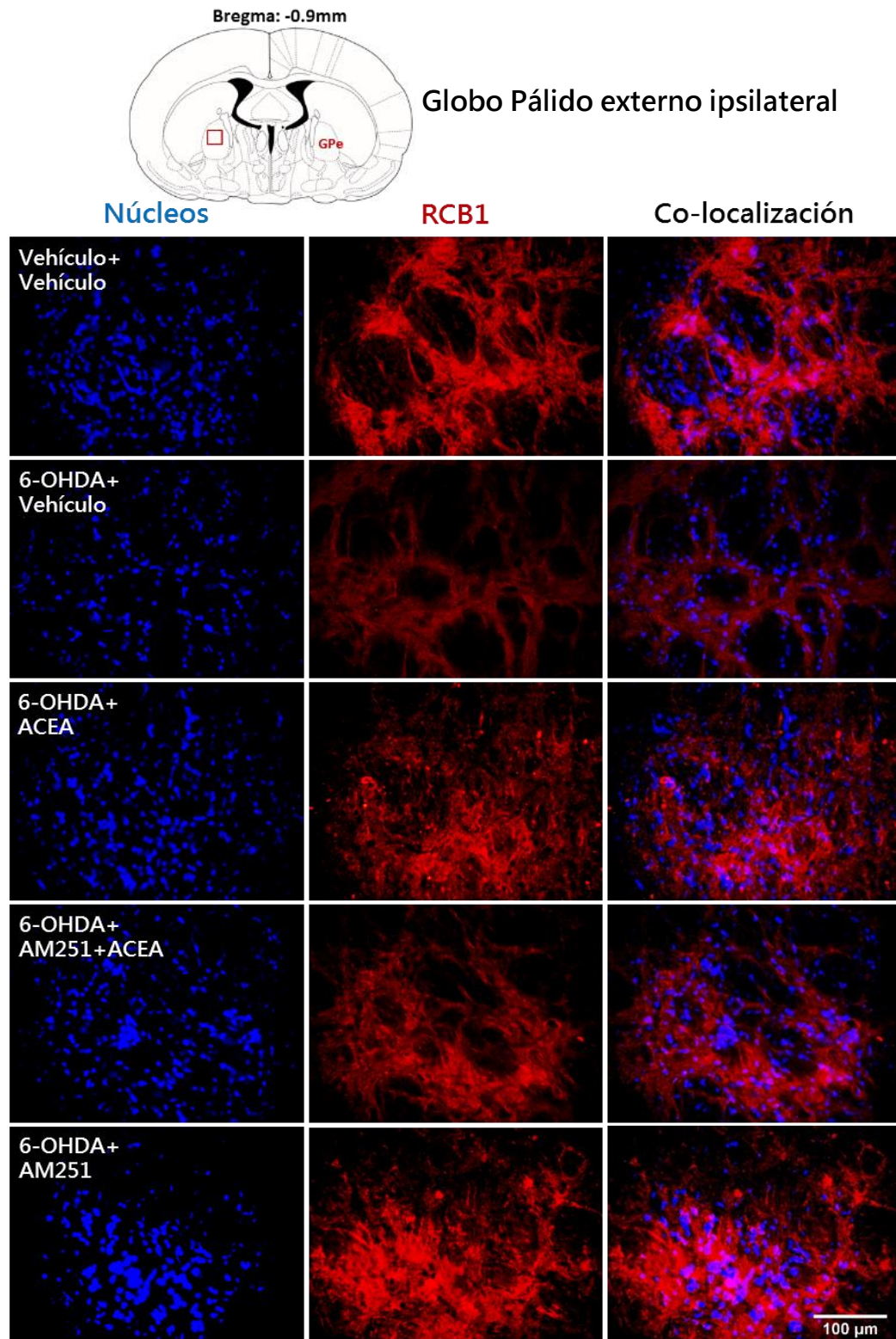


Figura 20. Expresión del receptor CB1 en el GPe ipsilateral de ratas hemiparkinsonianas. Esquema de un corte coronal de cerebro de rata (Paxinos y Watson, 1998) y las fotomicrografías de cada grupo experimental con los diferentes tratamientos farmacológicos, que muestran en la primera columna los núcleos marcados con DAPI, en la segunda columna la expresión del receptor CB1 (marca roja) en el GPe y en la tercera columna la co-localización de los núcleos y el RCB1.

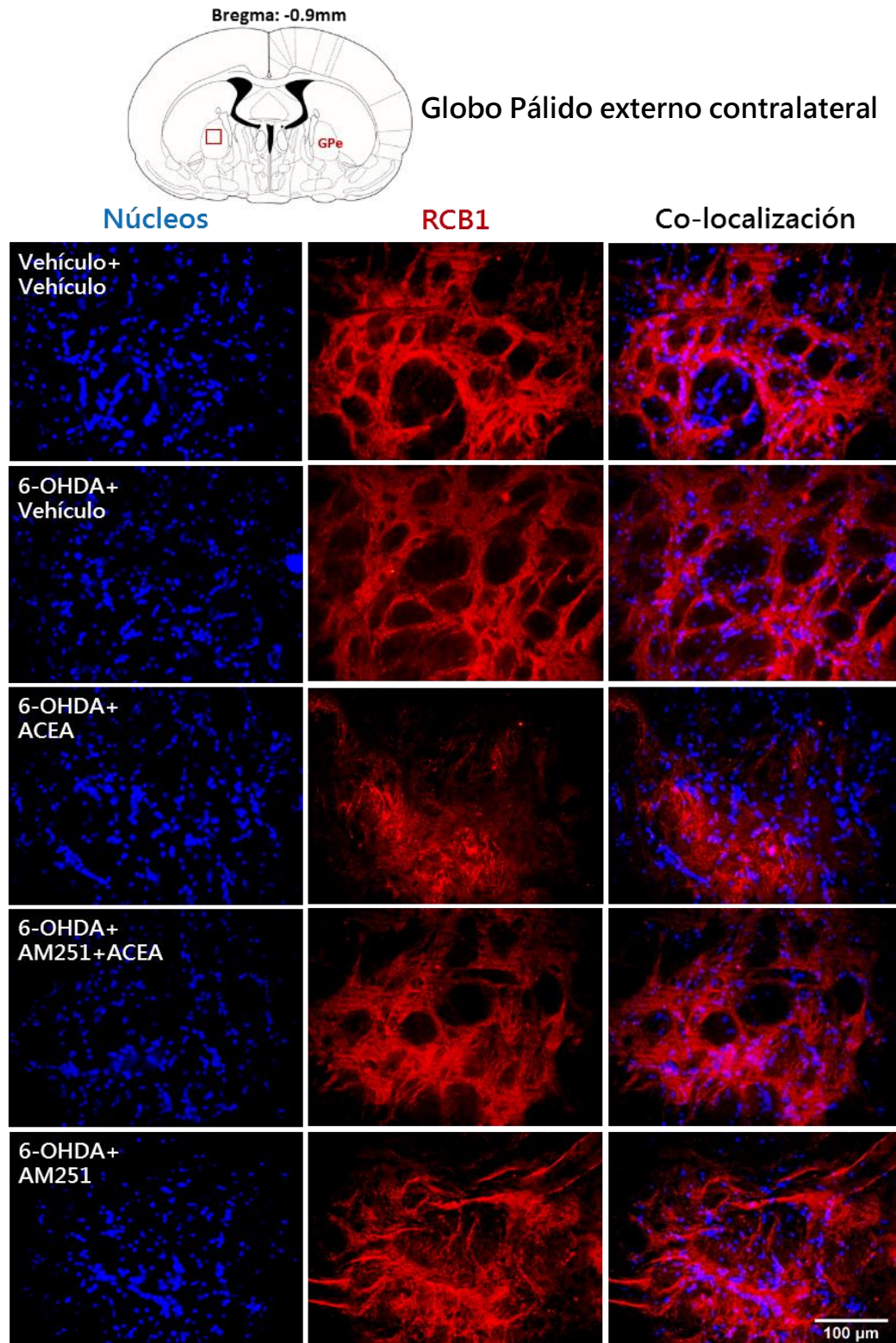


Figura 21. Expresión del receptor CB1 en el GPe contralateral de ratas hemiparkinsonianas. Esquema de un corte coronal de cerebro de rata (Paxinos y Watson, 1998) y las fotomicrografías de cada grupo experimental con los diferentes tratamientos farmacológicos, que muestran en la primera columna los núcleos marcados con DAPI, en la segunda columna la expresión del receptor CB1 (marca roja) en el GPe y en la tercera columna la co-localización de los núcleos y el RCB1.

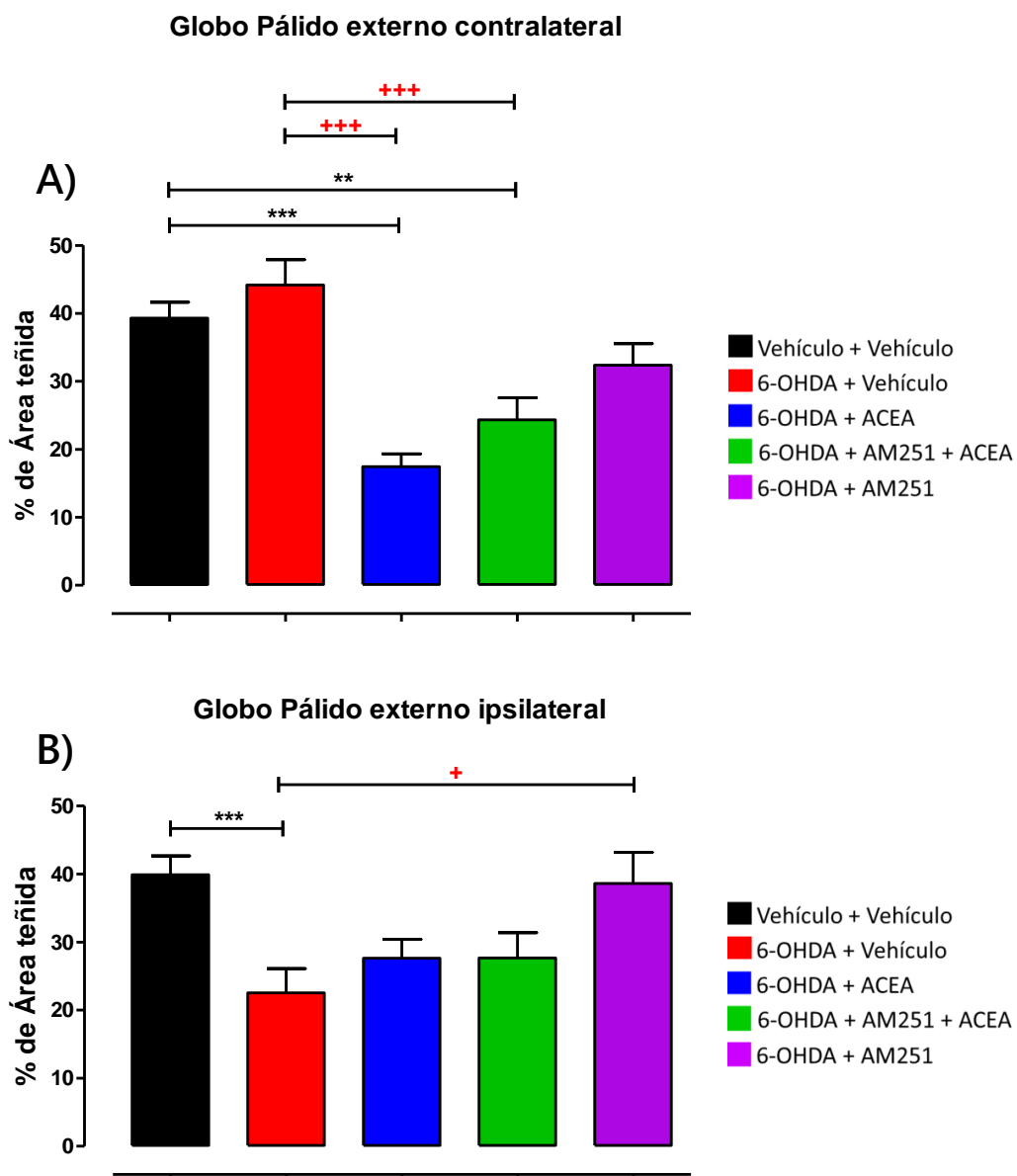


Figura 22. Porcentaje de área teñida por la inmunorreactividad del receptor CB1 en el Globo Pálido externo de ratas hemiparkinsonianas. Se muestran los resultados del análisis densitométrico de la expresión del receptor CB1, que se expresan como el % del área teñida de cada uno de los grupos experimentales en A) GPe contralateral y B) GPe ipsilateral a la lesión. Se realizó una ANOVA de una vía con un post-test Bonferroni y un nivel de significancia $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$. * vs Vehículo+Vehículo y + vs 6-OHDA+Vehículo.

7. DISCUSIÓN

Actualmente la L-DOPA sigue siendo el tratamiento primario para la sintomatología de la EP, sin embargo, su uso crónico está relacionado con el desarrollo de fluctuaciones motoras y discinesias en los pacientes (Obeso y cols., 2000). Por lo tanto, la investigación en curso busca nuevas terapéuticas no dopaminérgicas capaces de atenuar los déficits motores sin producir dichos efectos secundarios. Los cannabinoides son considerados como agentes terapéuticos potenciales, ya que no sólo han demostrado tener un efecto neuroprotector sino que también han sido evaluados por su capacidad para aliviar los síntomas motores observados en la EP (More y Choi, 2015).

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la activación y bloqueo del receptor CB1 en el Globo Pálido externo sobre las habilidades motoras finas de ratas hemiparkinsonianas, obteniéndose como resultados que la activación del receptor CB1 no ejerce efecto alguno sobre ellas y su bloqueo no produce una mejoría, al contrario, la administración intrapalidal del antagonista AM251 [10 µM] disminuye las habilidades motoras finas de ratas hemiparkinsonianas.

La administración unilateral de 6-OHDA en el haz medial del cerebro es un modelo experimental de la EP, ya que causa la degeneración progresiva y retrograda de las neuronas dopaminérgicas en la SNc. Por lo que, al evaluar a los sujetos experimentales 14 días post-lesión con la conducta de giro inducida por apomorfina, las ratas administradas con 6-OHDA presentaron giros contralaterales a la lesión, mientras que el grupo administrado con el vehículo no presentó ningún giro (Figura 16B). Estos resultados indican que el grupo con 6-OHDA presenta una denervación dopaminérgica mayor al 70% y una pérdida del 90% de dopamina en el estriado ipsilateral, lo cual se ha descrito que causa una sensibilización de los receptores dopaminérgicos postsinápticos (Deumens y cols., 2002). Por lo que al administrar un agonista dopaminérgico como la apomorfina, esta desencadena una mayor respuesta en el hemisferio ipsilateral, que se refleja en un incremento de la actividad de la pata contralateral a la lesión y en consecuencia producir la conducta de giro.

La disminución de dopamina en el estriado produce cambios neuroquímicos en el circuito de los GB, de manera que la modulación entre la vía directa e indirecta no se realiza de manera normal y se produce la sobreactivación de la vía estriado-palidal (Kita y Kita, 2011), por lo que

la inhibición del NST no se llevará a cabo y habrá una mayor actividad de los núcleos de salida (GPi/SNr), que en consecuencia producirá una disminución en la actividad motora (Freeze y cols., 2013). Estos hechos se relacionan con los resultados obtenidos en las evaluaciones conductuales, ya que las ratas lesionadas con 6-OHDA presentaron un menor número de pastillas comidas, así como un menor número de movimientos de pronar, asir y supinar con la extremidad contralateral a la lesión durante las evaluaciones en el periodo de post-lesión. Los resultados anteriormente mencionados concuerdan con estudios previos, en los que al producir una depleción dopaminérgica las habilidades motoras finas de la extremidad superior contralateral se ven afectadas (Whisaw y cols., 1996; Galván y cols., 2001; Mendieta y cols., 2009). Además de la pérdida de dopamina en el estriado, también se ha descrito una disminución de la concentración de este neurotransmisor en el GPe, y que la administración intrapalidal de dopamina provoca una recuperación de hasta el 60% en el número de pastillas comidas por ratas hemiparkinsonianas evaluadas en el modelo de la escalera (Galván y cols., 2001), por lo que el GPe es un núcleo crucial para la regulación de la vía indirecta y que podría tener una importante participación para el correcto control de los movimientos finos.

Estudios en pacientes con enfermedad de Parkinson han demostrado que el sistema de señalización endocanabinoide se encuentra más activo, ya que en el líquido cefalorraquídeo de pacientes no tratados existen niveles elevados de AEA (Pisani y cols., 2011), así como una mayor densidad del receptor CB1 en los GB (Lastres-Becker y cols., 2001), lo cual también se ha observado en diferentes modelos animales e inclusive se ha relacionado que esta sobre activación se encuentra participando de manera directa en la hipocinesia generada por la falta de dopamina (Di Marzo y cols., 2000; Muñoz-Arenas, 2010).

Si bien se ha demostrado que la activación del receptor CB1 en el GPe de ratas con lesión dopaminérgica disminuye la actividad motora evaluada en el campo abierto e incrementa la asimetría motora en el modelo de ajuste de pasos y conducta de giro (Muñoz-Arenas, 2010), no se encontraron resultados similares, ya que la administración intrapalidal del agonista ACEA no mostró ningún efecto sobre las habilidades motoras finas evaluadas en la escalera ni la asimetría motora en la prueba de conducta de giro. De igual forma, los resultados obtenidos no coinciden a los reportados por Mclaughlin y cols. (2000) que demuestran que el Δ^9 -tetrahidrocanabinol (THC) produce una disrupción del control del movimiento fino en rata, al evaluarlo en un modelo de condicionamiento operante, sin embargo, es importante mencionar que la

administración del THC fue por vía intraperitoneal, por lo que los efectos que observaron es posible que no sólo se atribuyan al receptor CB1 en los GB sino también en otro sitio con una gran densidad de estos receptores, como el cerebelo.

Por otro lado, es importante considerar otros factores farmacológicos como la concentración y que pudiera ser una posible explicación de la ausencia de efecto con la administración del agonista (ACEA) del receptor CB1, ya que se ha descrito que el efecto que tiene la activación del receptor CB1, en rebanadas de GPe de rata, sobre la liberación de GABA tiene un comportamiento bimodal, pues a bajas concentraciones incrementa su liberación mientras que a altas concentraciones la inhibe (González y cols., 2009).

Diversos estudios han propuesto el bloqueo de los receptores CB1 como una posible estrategia terapéutica en el tratamiento de la EP, ya que se han observado que su bloqueo tanto sistémicamente (Di Marzo y cols., 2000) como en el GPe (Muñoz-Arenas, 2010) incrementan la actividad motora y disminuyen la asimetría motora de ratas hemiparkinsonianas en el modelo de ajuste de pasos, el cual evalúa la capacidad de la rata para utilizar su extremidad anterior y mantener el centro de gravedad cuando se imponen cambios de peso rápido, lo cual se relaciona con síntomas motores similares que afectan negativamente a esta capacidad, como la acinesia y anomalías posturales característicos de la EP. Una de las ventajas de este modelo es que se puede emplear para evaluar posibles fármacos antiparkinsonianos inclusive en ratas discinéticas, ya que para realizar la prueba la rata se mantiene firmemente por el investigador y este hecho contrarresta el efecto incapacitante de la discinesia, sin embargo, este factor también se considera una variable importante para la reproducibilidad de la prueba (LeDoux, 2005). Por otra parte, el antagonismo del RCB1 también se ha sugerido que podría ser eficaz sólo en circunstancias particulares, como cuando existe una lesión dopaminérgica muy severa (Fernández-Espejo y cols., 2005), por lo que se propone a los antagonistas del receptor CB1 como agentes farmacológicos que coadyuven a la terapéutica ortodoxa con L-DOPA o fármacos anti-parkinsonianos útiles para circunstancias en las que la terapia de reemplazo dopaminérgico clásico no tenga efecto en los pacientes. Sin embargo, en el presente trabajo no encontramos ninguna mejoría con el antagonismo farmacológico del RCB1 con AM251 (10 µM) en el GPe, tanto en las habilidades motoras finas como en la asimetría motora de ratas hemiparkinsonianas, por el contrario, durante los primeros días del tratamiento farmacológico se observó una disminución tanto del número de pastillas comidas como de los movimientos

finos de asir y supinar, este hecho se podría explicar por la participación del receptor huérfano GPR55, ya que se ha reportado que el AM251 actúa como un agonista para dicho receptor.

Debido a la observación de que algunos compuestos cannabinoides producen efectos independientes a los receptores de cannabinoides CB1 y CB2, se logró identificar al receptor GPR55, el cual se considera como un nuevo receptor a cannabinoides. Este receptor puede acoplarse a proteínas G_q y $G_{12/13}$ (Ross, 2008) y se ha descrito que su ARNm se expresa de manera importante en el estriado de rata (Sawzdargo y cols., 1999), además, recientemente Muñoz-Arenas en el 2014, describe la presencia de la proteína del receptor GPR55 en el GPe de rata, tanto en terminales nerviosas como en astrocitos, y que dicho receptor juega un papel importante en la modulación de la neurotransmisión GABAérgica. Ella demuestra que el receptor GPR55 es capaz de regular la captura de GABA neuronal, ya que al activar a dicho receptor con su agonista endógeno el Lisofosfatidilinositol (LPI), así como con el AM251, observa una disminución en la captura de GABA en sinaptosomas de GPe, y que dicho evento se relaciona con una disminución en la actividad motora evaluada en campo abierto y campo cerrado de ratas intactas.

Una posible explicación del por qué se observa una disminución en las habilidades motoras finas de ratas hemiparkinsonianas a las cuales se les administró de manera intrapalidal el fármaco AM251, es en base al trabajo de Muñoz-Arenas (2014), ya que puede que este fármaco además de actuar como el antagonista del receptor CB1 ($IE_{50}=8nM$) también este activando al receptor GPR55 ($CE_{50}=39nM$) y en consecuencia incrementa la concentración de GABA en el espacio sináptico, debido a una disminución en la captura de dicho neurotransmisor, ya que ella propone que la activación del receptor GPR55 mediante su acople a una proteína G_q podría estar modulando la actividad del transportador de GABA neuronal GAT-1 de manera negativa, lo cual producirá una inhibición de las neuronas del GPe (Kita y Kita, 2011). Esta inhibición del GPe traerá como consecuencia un incremento en la actividad glutamatérgica del NST hacia los núcleos de salida (GPi/SNr), los cuales, debido a su transmisión GABAérgica, producen una inhibición del tálamo y en consecuencia, causar una disminución en la transmisión glutamatérgica hacia la corteza motora, lo cual se ve reflejado en una disminución de los procesos motores (Obeso y Lanciego, 2011; Freeze y cols., 2013).

El receptor CB1 pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, y la función de estos es regulada mediante un proceso de internalización. La exposición repetida a cannabinoides induce el desacoplamiento de las proteínas G (desensibilización) para posteriormente internalizarse y finalmente ser reciclado o llevado a su degradación (downregulation), además, se ha descrito que este receptor es capaz de autorregularse por la unión de cannabinoides, ya que múltiples administraciones de THC disminuyen los niveles del ARNm del receptor CB1 (Corchero y cols., 1999). De manera que la administración repetida de cannabinoides, como el THC, produce un efecto de tolerancia, lo cual podría considerarse como una limitante para el desarrollo terapéutico de estos compuestos (Gyombolai y cols., 2013).

Chaves-Kirsten y cols. (2013) describen que en ratas lesionadas con 6-OHDA disminuye la expresión del receptor CB1 en el circuito de los GB, posiblemente esto sea consecuencia de un efecto compensatorio del sistema, ya que también existe un incremento en la concentración de los endocannabinoides (Di Marzo y cols., 2000), los cuales seguramente produzcan una sobre activación de los receptores CB1. Estos hechos concuerdan con los resultados observados en el presente trabajo, ya que el grupo únicamente con la lesión (6-OHDA+vehículo) muestra una menor expresión del receptor CB1 en el GPe ipsilateral a la lesión. La activación (6-OHDA+ACEA) del receptor CB1 no provocó cambios en la expresión del GPe ipsilateral, sin embargo, en el GPe contralateral la expresión del CB1 disminuyó significativamente, como ya se ha mencionado anteriormente, el agonismo farmacológico puede producir la endocitosis del receptor, y una proteína que se ha descrito tiene un importante papel en esta función es la β -arrestina 2, esta proteína puede mediar la desensibilización del receptor, la internalización, y su señalización (Gyombolai y cols., 2013), así como también la exposición repetida a cannabinoides puede disminuir la transcripción de dicho receptor, ya que su sobreactivación disminuye los niveles del ARNm del RCB1 (Corchero y cols., 1999). Por lo que de manera conjunta tanto la disminución en la expresión del receptor CB1 que observamos en las ratas del grupo 6-OHDA+ACEA, como a la posible desensibilización que ocurre en dicho receptor debido a la exposición repetida del agonista ACEA, podría ser otra posible respuesta del por qué no encontramos ningún cambio en relación a los movimientos finos evaluados en la escalera. Por otra parte, en el grupo tratado con el antagonista AM251 se observó un incremento de la expresión del RCB1 en el GPe ipsilateral a la lesión, que posiblemente se deba a una upregulation de la proteína, debido a que su bloqueo no permita que se lleve a cabo la señalización del receptor y en consecuencia se

incremente la expresión del mismo en la membrana celular para que sea capaz de reconocer a los endocannabinoides.

El presente trabajo muestra resultados controversiales a la literatura en relación a la propuesta de utilizar fármacos antagonistas del RCB1 para mejorar la sintomatología de la EP, sin embargo, es importante considerar factores preponderantes como las dosis y la cronicidad de los tratamientos empleados con los diversos cannabinoides, y es que inclusive entre ellos se producen respuestas diferentes sobre el receptor, que dependen de su afinidad o eficacia por el mismo. Además, la presencia de nuevos sitios diana que responden a los cannabinoides, como el receptor GPR55, hacen aún más complejo entender la función del sistema endocanabinoide pero que también ayudan a entender los múltiples efectos que muestra este sistema. Por lo que la investigación sobre los receptores CB1 es imprescindible tanto para comprender mejor su fisiología como para el desarrollo de nuevas terapéuticas farmacológicas que coadyuven a las existentes en enfermedades neurodegenerativas como la EP, donde se ha descrito que el SEC participa de manera importante en su sintomatología.

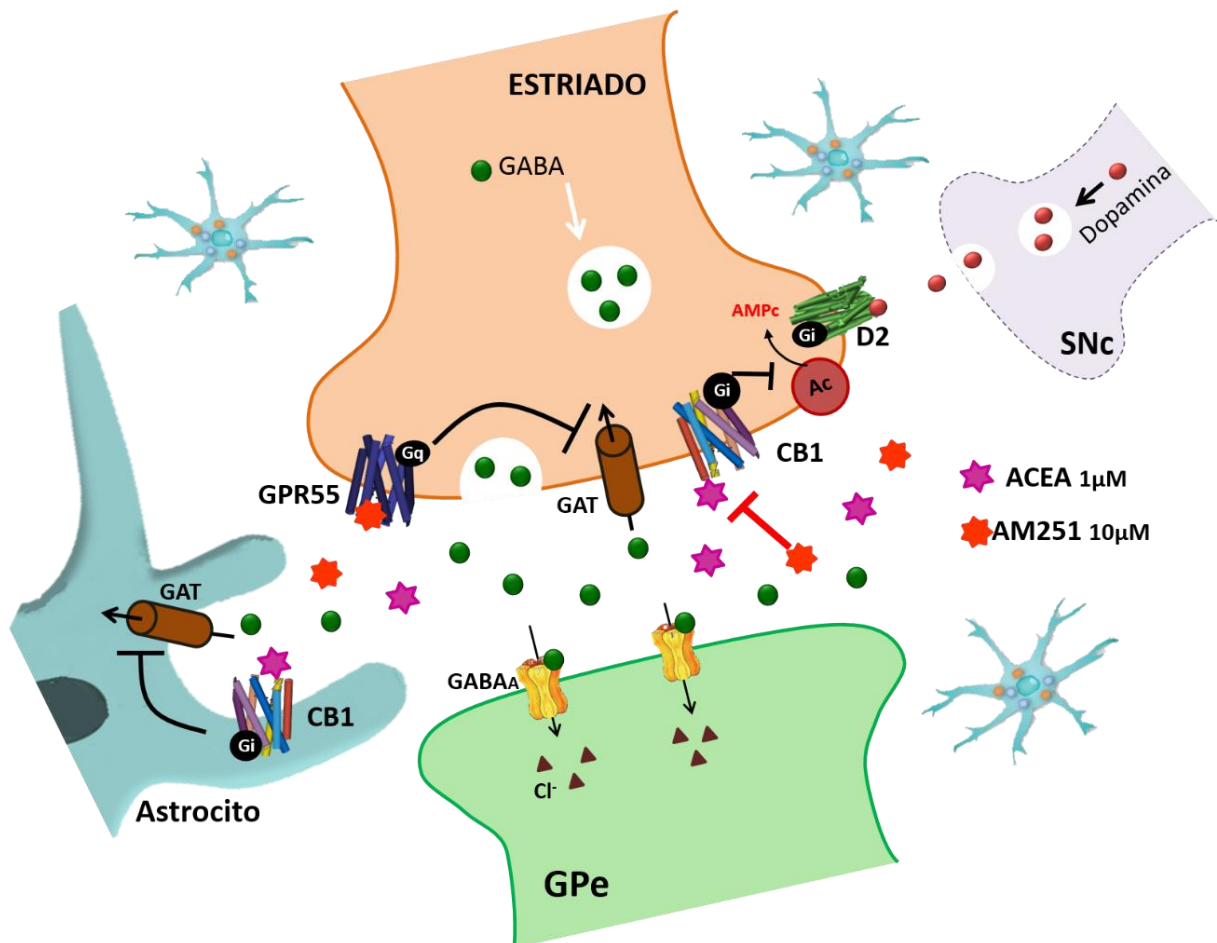


Figura 23. Esquema hipotético. Los receptores CB1 se expresan abundantemente en el GPe y tienen una importante participación en la modulación de la neurotransmisión GABAérgica tanto mediante sus mecanismos de liberación como de captura, sin embargo, recientemente se ha descrito la presencia de un nuevo receptor que podría ser catalogado como un nuevo receptor a canabinoides, el receptor GPR55 y su activación es capaz de modular la captación de GABA en las terminales nerviosas estriado palidales, lo cual producirá una inhibición de la actividad del GPe y en consecuencia un incremento de la liberación glutamatérgica por parte del NST hacia los núcleos de salida (GPi/SNr), dichos eventos se verán reflejados en una disminución de los procesos motores, como una disminución de las habilidades motoras finas que observamos en el presente trabajo.

8. CONCLUSIONES

- I. La activación del receptor CB1 en el GPe no modifica las habilidades motoras finas ni la asimetría motora de ratas hemiparkinsonianas.
- II. El bloqueo del receptor CB1 en el GPe disminuye las habilidades motoras finas de ratas hemiparkinsonianas.
- III. La activación del receptor CB1 disminuye su expresión en el GPe contralateral a la lesión de ratas hemiparkinsonianas.
- IV. El bloqueo del receptor CB1 incrementa su expresión en el GPe ipsilateral a la lesión de ratas hemiparkinsonianas.

9. PERSPECTIVAS

- I. Evaluar una curva dosis-respuesta de la activación del receptor CB1 sobre las habilidades motoras finas de ratas hemiparkinsonianas.
- II. Estudiar la participación que podría jugar el receptor GPR55 sobre las habilidades motoras finas de ratas hemiparkinsonianas.
- III. Evaluar la expresión del receptor CB1 en el GPe de ratas hemiparkinsonianas.
- IV. Evaluar las concentraciones de GABA *in vivo* en el GPe de ratas hemiparkinsonianas posterior a la activación tanto del receptor CB1 como del receptor GPR55.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Albin R.L., Young A.B., Penney J.B. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* (1989); 12:366-75.
- 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.
- Bisogno T., Berrendero F., Ambrosino G., Cebeira M., Ramos J.A., Fernández-Ruiz J.J., Di Marzo V. Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function. *Biochem Biophys Res Commun.* (1999); 256: 377–380.
- Brown A.J. Novel cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol.* (2007); 152: 567-575.
- Carriba-Domínguez P. Heteromerización de receptores de adenosina A2A, dopamina D2 y cannabinoides CB1. Implicaciones farmacológicas y funcionales. Tesis de Doctorado. Universitat de Barcelona. (2007).
- Chaves-Kirsten G.P., Mazucanti C.H., Real C.C., Souza B.M., Britto L.R., Torráo 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:e76874.
- Clarke J., Ploughman M., Corbett D. A qualitative and quantitative analysis of skilled forelimb reaching impairment following intracerebral hemorrhage in rats. *Brain Res.* (2007); 1145: 204-212.
- 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.
- 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: 303-17.
- Di Marzo V., HillVM.P., Bisogno T., Crossman A.R., Brotchie J.M. Enhanced levels of endocannabinoids 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.
- Dinh T.P., Carpenter D., Leslie F.M., Freund T.F., Katona I., Sensi S.L. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci.* (2002); 99: 819-824.
- Egertová M., Elphick M.R. Localisation of cannabinoid receptors in the rat brain using antibodies to the intracellular C-terminal tail of CB. *J Comp Neurol.* (2000); 422:159-171.
- Felder C.C., Joyce K.E., Briley E.M., Glass M., Mackie K.P., Fahey K.J., Cullinan G.J., Hunden D.C., Johnson D.W., Chaney M.O., Koppel G.A., Brownstein M., LY320135 a novel cannabinoid CB1 receptor

- antagonist, unmasks coupling of the CB1 receptor to stimulation of cAMP accumulation. *J Pharmacol Exp Ther.* (1998); 284: 291-297.
- Fernández-Espejo E., Caraballo I., de Fonseca F.R., El Banoua F., Ferrer B., Flores J.A., Galan-Rodríguez B. Cannabinoid CB1 antagonists possess antiparkinsonian efficacy only in rats with very severe nigral lesion in experimental parkinsonism. *Neurobiol Dis.* (2005); 18: 591-601.
- Florán B, Florán 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.
- 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: 18531-18539.
- Fuchs H., Nagel J., Hauber W. Effects of physiological and pharmacological stimuli on dopamine release in the rat globus pallidus. *Neurochem Int.* (2005); 47:474-481.
- Galván A., Florán B., Erlij D., Aceves J. Intrapallidal dopamine restores motor deficits induced by 6-hydroxydopamine in the rat. *J Neural Transm.* (2001); 108: 153-166.
- Gaoni Y., Mechoulam R. Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Soc Chem.* (1964); 86: 1646-1647
- Gittis A.H., Berke J.D., Bevan M.D., Chan C.S., Mallet N., Morrow M.M., Schmidt R. New roles for the external globus pallidus in basal ganglia circuits and behavior. *J Neurosci.* (2014); 34: 15178-83.
- Giuffrida A., Parsons L.H., Kerr T.M., Rodríguez de Fonseca F., Navarro M., Piomelli D. Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nat Neurosci.* (1999); 2: 358-363
- Glinka Y., Gassen M., Youdim M.B. Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity. *J Neural Transm Suppl.* (1997); 50: 55-66.
- Glass M., Dragunow M., Faull R.L.M. The pattern of neurodegeneration in Huntington's disease: a comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and GABA-A receptor alterations in the human basal ganglia in Huntington's disease. *Neuroscience.* (2000); 97: 505-519
- González B., Paz F., Florán L., Aceves J., Erlij D., Florán B. Cannabinoid agonists stimulate [3H]GABA release in the globus pallidus of the rat when G(i) protein-receptor coupling is restricted: role of dopamine D2 receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* (2009); 328: 822-828.
- González Esparza L. Historia natural de la enfermedad de Parkinson idiopática. En enfermedad de Parkinson perspectivas actuales y futuras. León Flores L. y Cuevas García C. Nuevo León, México: Planeación y Desarrollo Editorial S.A. de C.V. (2008); 3-6
- Groenewegen H.J. The basal ganglia and motor control. *Neural Plast.* (2003); 10: 107-120.

- Gubellini P., Picconi B., Bari M., Battista N., Calabresi P., Centonze D., Bernardi G., Finazzi-Agrò A., Maccarrone M. Experimental parkinsonism alters endocannabinoid degradation: implications for striatal glutamatergic transmission. *J Neurosci.* (2002); 22:6900-6907.
- Gyombolai P., Boros E., Hunyady L., Turu G. Differential β -arrestin 2 requirements for constitutive and agonist-induced internalization of the CB1 cannabinoid receptor. *Mol Cell Endocrinol.* (2013); 372: 116-27.
- 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.
- Herkenham M., Lynn A.B., Little M.D., Johnson M.R., Melvin L.S., De Costa D.R., Rice K.C. Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci.* (1990); 87: 1932–1936.
- Howlett A.C. The CB1 cannabinoid receptor in the brain. *Neurobiol Dis.* (1998); 5: 405-416.
- Kirik D., Rosenblad C., Björklund A. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Exp Neurol.* (1998); 152: 259-277.
- Kita H., Kita T. Role of striatum in the pause and burst generation in the globus pallidus of 6-OHDA-treated rats. *Front Syst Neurosci.* (2011); 8:42.
- Köfalvi A., Rodrigues R.J., Ledent C., Mackie K., Vizi E.S., Cunha R.A., Sperlágh B. Involvement of cannabinoid receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rodent striatum: a combined immunochemical and pharmacological analysis. *J Neurosci.* (2005); 25: 2874-2884.
- Lastres-Becker I., Cebeira M., de Ceballos M., Zeng B.Y., Jenner P., Ramos J.A, Fernández-Ruiz J.J. Increased cannabinoid CB1 receptor binding and activation of GTP-binding proteins in the basal ganglia of patients with Parkinson's disease and MPTP-treated marmosets. *Eur J Neurosci.* (2001); 14: 1827–1832.
- Mailleux P., Vanderhaeghen J.J. Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience.*(1992); 48: 655–668.
- Mallet N., Micklem B.R., Henny P., Brown M.T., Williams C., Bolam J.P., Nakamura K.C., Magill P.J. Dichotomous organization of the external globus pallidus. *Neuron.* (2012); 74: 1075-86.
- Maneuf Y.P., Nash J.E., Croosman A.R., Brotchie J.M. Activation of the cannabinoid receptor by Δ^9 -THC reduces GABA uptake in the globus pallidus. *Eur J Pharmacol.* (1996); 308: 161–164.
- 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.

- McLaughlin P.J., Delevan C.E, Carnicom S., Robinson J.K., Brener J. Fine motor control in rats is disrupted by $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol. *Pharmacol Biochem Behav.* (2000); 66: 803–809
- Mendieta L, Venegas B, Moreno N, Patricio A, Martínez I, Aguilera J, Limón ID. The carboxyl-terminal domain of the heavy chain of tetanus toxin prevents dopaminergic degeneration and improves motor behavior in rats with striatal MPP(+)-lesions. *Neurosci Res.* (2009); 65: 98-106.
- México. Guía de práctica clínica, Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Secretaría de Salud. Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud. (2010); pp. 8 y 10.
- Montoya C.P., Campbell-Hope L.J., Pemberton K.D., Dunnet S.B. The "staircase test" : a measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats. *J. Neurosci. Methods.* (1991); 36: 219–228.
- More S.V., Choi D.K. Promising cannabinoid-based therapies for Parkinson's disease: motor symptoms to neuroprotection. *Mol Neurodegener.* (2015); 10: 17.
- Mosier K, Lau C., Wang Y., Venkadesan M., Valero-Cuevas F.J., Controlling instabilities in manipulation requires specific cortical-striatal-cerebellar networks. *J Neurophysiol.* (2011); 105: 1295-305
- Munro S., Thomas K.L., Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature.* (1993); 365:61-65.
- Muñoz Arenas M.G. Papel de los receptores CB1 y D2 sobre los niveles de GABA en Globo Pálido externo y la actividad motora de rata con lesión dopaminérgica. Tesis de Maestría. BUAP. (2010).
- Obeso J.A., Lanciego J.L. Past, present, and future of the pathophysiological model of the Basal Ganglia. *Front Neuroanat.* (2011); 12: 5:39.
- Obeso J.A., Olanow C.W., Nutt J.G. Levodopa motor complications in Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* (2000); 23: S2-7.
- Obeso J.A., Rodríguez-Oroz M.C., Javier Blesa F., Guridi J. The globus pallidus pars externa and Parkinson's disease. Ready for prime time? *Exp Neurol.* (2006); 202: 1-7.
- Parkinson J. An essay on the shaking palsy. Sherwood, Neely y Jones. (Eds). Whittingham y Rowland. (1817) Londres.
- Parent A., Hazrati L.N. Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Res Brain Res Rev.* (1995); 20:128-54.
- Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press.(1998) E.E.U.U.
- Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signaling. *Nat Rev Neurosci.* (2003); 11: 873-874

- Pisani V., Madeo G., Tassone A., Sciamanna G., Maccarrone M., Stanzione P., Pisani A. Homeostatic changes of the endocannabinoid system in Parkinson's disease. *Mov Disord.* (2011); 26: 216-22.
- Rajput A.H., Sitte H.H., Rajput A., Fenton M.E., Pifl C., Hornykiewicz O. Globus pallidus dopamine and Parkinson motor subtypes: clinical and brain biochemical correlation. *Neurology.* (2008); 70: 1403-10.
- Rodríguez de Fonseca F., Del Arco I., Bermudez-Silva F.J., Bilbao A., Cippitelli A., Navarro M. The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. *Alcohol Alcohol.* (2005); 40:2-14.
- Romero J., de Miguel R., Ramos J.A., Fernández-Ruiz J.J. The activation of cannabinoid receptors in striatonigral neurons inhibited GABA uptake. *Life Sci.* (1998); 62: 351–363
- 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.
- Ross R.A. The enigmatic pharmacology of GPR55. *Cell Press.* (2008); 30: 156-163.
- Sañudo-Peña M.C., Tsou K., Walker J.M. Motor actions of cannabinoids in the basal ganglia output nuclei. *Life Sci.* (1999); 65: 703–713.
- Sawdargo 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, GPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Mol Brain Res.* (1999); 64: 193-198.
- Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación (2001). Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario oficial de la federación de México. Estados Unidos Mexicanos.
- Soo Lee C., Park W.J., Ko H.H., Han E.S. Differential involvement of mitochondrial permeability transition in cytotoxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium and 6-hydroxydopamine. *Mol. and Cell Biochem.* (2006); 289: 193-200.
- Stella N., Schweitzer P., Piomelli D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature.* (1997); 388: 773-778.
- Sugiura T., Kondo S., Sukagawa A., Nakane S., Shinoda A., Itoh K., Yamashita K., Waku K. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun.* (1995); 215: 89–97.

- Svízenská I., Dubový P., Sulcová A. Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures a short review. *Pharmacol Biochem Behav.* (2008); 90: 501-511.
- Ungerstedt U., Arbuthnott G.W. Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res.* (1970); 24: 485–493.
- Van Laere K., Casteels C., Lunsken S., Goffin K., Grachev I.D., Bormans G., Vandenberghe W. Regional changes in type 1 cannabinoid receptor availability in Parkinson's disease in vivo. *Neurobiol Aging.* (2012); 33: 620.e1-8.
- Van Waes V1, Beverley JA, Siman H, Tseng KY, Steiner H. CB1 Cannabinoid Receptor Expression in the Striatum: Association with Corticostriatal Circuits and Developmental Regulation. *Front Pharmacol.* (2012); 3: 21.
- Whishaw I.Q., Woodward N.C., Miklyaeva E., Pellis S.M. Analysis of limb use by control rats and unilateral DA-depleted rats in the Montoya staircase test: movements, impairments and compensatory strategies. *Behav Brain Res.* (1997); 89: 167-77.

11. CONGRESOS



Efecto de la activación de los receptores CB1 estriatales sobre la actividad y asimetría motora de ratas hemiparkinsonianas

Báez Cordero Ana Silvia¹ (Estudiante de licenciatura), Muñoz Arenas María de Guadalupe¹, Sánchez González Alejandra¹, Martínez García María Isabel², Limón Pérez de León Ilhuicamina Daniel¹

¹Laboratorio de Neurofarmacología, BUAP, ²Laboratorio de Neuroquímica, BUAP



Estudio del receptor CB1 en el Globo Pálido externo sobre las habilidades motoras finas de ratas hemiparkinsonianas

Báez Cordero Ana Silvia (Estudiante de licenciatura), Muñoz Arenas María de Guadalupe, Sánchez Cano Fredy, Ramírez Hernández Eleazar, Limón Pérez de León Ilhuicamina Daniel

Laboratorio de Neurofarmacología, FCQ-BUAP