



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN BIOQUÍMICA

*“El sistema endocannabinoide en células
fotorreceptoras y su modulación por luz”*

Estefania Chamorro Aguirre

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2022



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN BIOQUÍMICA

*“El sistema endocannabinoide en células
fotorreceptoras y su modulación por luz”*

Estefania Chamorro Aguirre

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2022

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Susana Juana Pasquaré

CODIRECTORA DE TESIS:

Dra. Virginia Lucía Gaveglio

PREFACIO

“Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctora en Bioquímica, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Cannabinología del Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB), dependiente de la Universidad Nacional del Sur (UNS) y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) durante el período comprendido entre el 31 de Mayo de 2016 y el 6 de Abril de 2022, bajo la dirección de la Dra. Susana Juana Pasquaré, Profesora Titular de la cátedra de Química Biológica II perteneciente al Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia (DBByF) de la UNS y Docente Investigadora por resolución del Ministerio de Educación, Cultura, Ciencia y Tecnología, y la codirección de la Dra. Virginia Lucía Gaveglio, Asistente de docencia de la cátedra de Química Biológica II del DBByF de la UNS e Investigadora Adjunta del CONICET.

El presente trabajo de Tesis fue financiado con subsidios otorgados por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT-2017-0718 y PICT-2014-1089) por la UNS (Proyectos de investigación consolidados SECyT-UNS 24/B250 y 24/B207) y por el CONICET (PIP N° 11220200100707). Agradezco a dichas instituciones y al INIBIBB por hacer posible la realización de esta Tesis.

6 de Abril de 2022

Estefania Chamorro Aguirre

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación
Continua

La presente Tesis ha sido aprobada el/...../....., mereciendo la calificación de..... (.....)

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la UNS, al INIBIBB, a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y al CONICET por brindarme todos los recursos necesarios para el desarrollo de esta tesis y por darme la posibilidad de formarme profesionalmente.

A mi directora, la Dra. Susana Pasquaré, por brindarme la oportunidad de participar en su grupo de investigación, enseñarme, guiarme y acompañarme en todo momento. Gracias por todos los instantes compartidos y por haberme elegido a pesar de haber estado en otro país y haberme conocido por primera vez a través de Skype.

A mi codirectora, la Dra. Virginia Gaveglio, por enseñarme y transmitirme todos sus tips, por sus ideas, entusiasmo, cariño y disposición.

A todos los integrantes del INIBIBB, quienes estuvieron predispuestos para ayudar y solucionar los imprevistos presentados. A la Dra. Jessica Luquez y al Dr. Martín Oresti por la ayuda en la determinación de la composición de los sustratos.

A las chicas y chicos del laboratorio, Ana, Vir, Estefi, Meli, Sabri y Vicente, por su amistad, disposición y consejos a nivel científico, por su apoyo, aliento y compañerismo, proporcionándome motivación y gusto por el trabajo en el laboratorio.

A mis amigos y amigas, Lore, Julie, Mayra, Jorge, Andrés y Jhonier por compartir conmigo alegrías y tristezas, por las largas charlas y los paseos al parque. A mi amiga, Adri, que aún en la distancia ha perdurado nuestra amistad y ha estado dispuesta a escucharme en todo momento. A mi novio, Javi por darme aliento,

escucharme y aconsejarme en las situaciones buenas y malas, y a su familia por compartir conmigo.

A mi papá que me ha dado su apoyo incondicional, por todo su empeño y esfuerzo para que pudiera continuar con mis estudios, y por su determinación que aún sigue siendo un ejemplo continuo para mi vida. A mi mamá, mis hermanos y mi sobrina por estar dispuestos a escucharme, por ser mi compañía y mi alegría aún en la distancia.

A mi primo, José y a su familia por compartir la información de las becas, por bríndame un lugar cuando lo necesité y por motivarme para seguir estudiando.

Muchas gracias a todos.

ESTEFANIA

**Dedicado a mis padres
y a mis hermanos que siempre
me apoyaron desde la distancia**

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	4
INTRODUCCIÓN	7
OBJETIVOS GENERALES	30
MATERIALES Y MÉTODOS	31
1. <i>Modelo experimental</i>	31
1.1 Exposición de la copa del ojo a la luz y obtención de los segmentos externos de bastones provenientes de retinas mantenidos en oscuridad (ROS O) y de retinas expuestas a luz (ROS L).....	31
1.2 Exposición de los segmentos externos de las células fotorreceptoras a la luz. Obtención de segmentos externos de bastones provenientes de retinas mantenidas en oscuridad y expuestas a luz (ROS B).....	34
1.3 Análisis electroforético de las proteínas de ROS O, ROS L y ROS B.....	34
2. <i>Inmunodetección de proteínas por Western Blot</i>	35
2.1 Preparación de las muestras	35
2.2 Electroforesis y transferencia de las proteínas	35
2.3 Bloqueo, incubaciones con anticuerpos e inmunodetección.....	36
3. <i>Preparación de sustratos radiomarcados empleados en la determinación de las actividades enzimáticas</i>	39
3.1 Obtención de [2- ³ H] fosfatidilcolina y [2- ³ H] triacilglicerol a partir de la incubación de retinas bovinas con [2- ³ H] glicerol	39
3.1.1 Incubación de las retinas bovinas con [2- ³ H] glicerol	39
3.1.2 Extracción, separación e identificación de los lípidos radiomarcados de las retinas bovinas	40
3.2 Obtención de [2- ³ H] diacilglicerol a partir de la hidrólisis de la [2- ³ H] fosfatidilcolina de la retina bovina	43
3.3 Obtención de [2- ³ H] monoacilglicerol a partir de la hidrólisis del [2- ³ H] triacilglicerol de la retina bovina.....	44
4. <i>Análisis de la composición de los ácidos grasos del [2-³H] diacilglicerol y [2-³H] monoacilglicerol</i>	45
4.1 Obtención de los metil ésteres de ácidos grasos.....	45
4.2 Análisis de los metil ésteres de ácidos grasos por cromatografía en fase gaseosa	46

5. Determinación de las actividades enzimáticas del metabolismo del 2-araquidonoilglicerol.....	47
5.1 Ensayo enzimático de la actividad de la diacilglicerol lipasa.....	47
5.2 Ensayo enzimático de la actividad de la lisofosfatidato fosfohidrolasa.....	48
5.3 Ensayo enzimático de la actividad de la monoacilglicerol lipasa	48
5.4 Extracción y separación de los sustratos y de los productos de las actividades enzimáticas	50
6. Ensayo experimental para analizar el rol de las proteínas involucradas en el proceso de fototransducción en el metabolismo del 2-araquidonoilglicerol.....	52
6.1 Incubación de los ROS con análogos de nucleótidos de guanina: GTP γ S y GDP β S.....	52
6.2 Extracción selectiva de proteínas que se asocian a la membrana del ROS empleando <i>buffers</i> de distinta fuerza iónica	53
6.2.1 Análisis electroforético de las fracciones de membrana y soluble de los ROS tratados con los <i>buffers</i> de distinta fuerza iónica.....	56
7. Ensayo experimental para analizar la acción de agonistas y antagonistas de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 sobre el metabolismo del 2-araquidonoilglicerol.....	56
7.1 Incubación de los ROS con agonistas y antagonistas de receptores CB1 y CB2	57
8. Métodos Analíticos	58
8.1 Determinación de proteínas.....	58
8.2 Determinación de la radioactividad por espectrometría de centelleo líquido	59
9. Análisis estadístico	59
CAPÍTULO I.....	61
ESTUDIO DEL METABOLISMO DEL 2-ARAQUIDONOILGLICEROL Y SU MODULACIÓN POR ESTÍMULO LUMÍNICO EN LOS SEGMENTOS EXTERNOS DE LOS BASTONES.....	61
RESULTADOS.....	62
1. Efecto de la luz en los niveles de las proteínas enzimáticas involucradas en el metabolismo del 2-araquidonoilglicerol.....	62
2. Efecto de la luz en los niveles de las proteínas receptoras a las que se unen los cannabinoides.....	64
3. Análisis electroforético de las proteínas de los ROS O y ROS L	66
4. Actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo del 2-araquidonoilglicerol.....	67

4.1 Actividad de la enzima diacilglicerol lipasa y su modulación por la luz...	67
4.1.1 Composición del diacilglicerol empleado como sustrato.....	67
4.1.2 Caracterización de la actividad de la diacilglicerol lipasa en ROS O y en ROS L.....	68
4.1.2.1 Actividad enzimática en función de la cantidad de proteínas y del tiempo de incubación.....	68
4.1.2.2 Modulación de la actividad enzimática por iones y detergentes	70
4.1.3 Actividad de la diacilglicerol lipasa en ROS O y en ROS L en diferentes períodos del año.....	71
4.1.4 Actividad de la diacilglicerol lipasa en ROS bajo diferentes condiciones de iluminación.....	72
4.2 Actividad de la enzima lisofosfatidato fosfohidrolasa y su modulación por la luz.....	73
4.2.1 Caracterización de la actividad de la lisofosfatidato fosfohidrolasa en ROS O y ROS L.....	73
4.2.1.1 Actividad enzimática en función de la cantidad de proteínas.....	73
4.2.2 Actividad de la lisofosfatidato fosfohidrolasa en ROS bajo diferentes condiciones de iluminación.....	75
4.3 Actividad de la monoacilglicerol lipasa y su modulación por luz	76
4.3.1 Composición del monoacilglicerol empleado como sustrato	76
4.3.2 Caracterización de la actividad de la monoacilglicerol lipasa	77
4.3.2.1 Actividad enzimática en función de la cantidad de proteínas.....	77
4.3.3 Actividad de la monoacilglicerol lipasa en ROS bajo diferentes condiciones de iluminación.....	78
DISCUSIÓN	80
CAPÍTULO II	100
ESTUDIO DE LA MODULACIÓN DEL METABOLISMO DEL 2-ARAQUIDONOILGLICEROL	100
RESULTADOS.....	101
A) EFECTO DE LAS PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN EL PROCESO DE FOTOTRANSDUCCIÓN.....	101
1. Acción de moduladores de la actividad de proteínas G en la regulación del metabolismo del 2-araquidonoilglicerol.....	101
1.1 Actividad de las enzimas de síntesis del 2-araquidonoilglicerol, diacilglicerol lipasa y lisofosfatidato fosfohidrolasa, en los ROS incubados en presencia de análogos de los nucleótidos de guanina: GTP γ S y GDP β S.....	101

1.2 Actividad de la enzima de hidrólisis del 2-araquidonoilglicerol, monoacilglicerol lipasa, en los ROS incubados en presencia de los análogos de nucleótidos de guanina: GTP γ S y GDP β S	104
2. Efecto de las proteínas que se asocian a la membrana del ROS en la regulación del metabolismo del 2-araquidonoilglicerol	105
2.1 Análisis electroforético de las proteínas de ROS O y ROS B tratados con <i>buffers</i> de diferente fuerza iónica.....	105
2.2 Actividad de la diacilglicerol lipasa y monoacilglicerol lipasa en ROS O y ROS B tratados con <i>buffers</i> de diferente fuerza iónica.....	107
2.2.1 Actividad de la diacilglicerol lipasa en ROS O y ROS B tratados con <i>buffers</i> de diferente fuerza iónica	107
2.2.2 Actividad de la monoacilglicerol lipasa en ROS O y ROS B tratados con <i>buffers</i> de diferente fuerza iónica	108
B) EFECTO DE AGONISTAS Y ANTAGONISTAS DE RECEPTORES CANNABINOIDES.....	110
1. Acción de agonistas y antagonistas de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 sobre el metabolismo del 2-araquidonoilglicerol	110
1.1 Efecto de agonistas y antagonistas de receptores cannabinoides sobre las actividades de las enzimas de síntesis del 2-araquidonoilglicerol.....	111
1.2 Efecto de agonistas y antagonistas de receptores cannabinoides sobre la actividad de la enzima de hidrólisis del 2-araquidonoilglicerol.....	114
DISCUSIÓN	116
CONCLUSIONES.....	126
BIBLIOGRAFÍA.....	128
TRABAJOS PUBLICADOS	142
PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTÍFICAS	143
ABREVIATURAS	145

RESUMEN

El sistema endocannabinoide (SEC) está formado por los receptores cannabinoideos (CB1 y CB2), los ligandos que se unen a ellos, el 2-araquidonoilglicerol (2-AG) y la anandamida (AEA), y las enzimas responsables del metabolismo de estos lípidos. Estas moléculas están involucradas en mecanismos intracelulares de gran relevancia, teniendo funciones neuromoduladoras y neuroprotectoras. En los últimos años, se ha intensificado el estudio del SEC en la retina, si bien se ha demostrado su presencia y la participación de algunos componentes en la función visual, aún se desconoce su contribución en la respuesta a la luz. La entrada de luz al ojo es censada por las proteínas receptoras ubicadas en los discos del segmento externo de las células fotorreceptoras. A este nivel, se inicia la conversión de la señal lumínica en señal eléctrica, proceso denominado fototransducción.

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral fue el de investigar la presencia del SEC en el segmento externo de los bastones de retinas bovinas (ROS) además de su modulación por el estímulo lumínico fisiológico. Este fue aplicado a la retina directamente o al ROS aislado proveniente de retinas mantenidas en oscuridad.

En una primera etapa de este trabajo de Tesis se demostró la presencia de los elementos del SEC (receptores y enzimas metabólicas) en el ROS y cómo era su modulación por luz. Los resultados señalan la presencia de los receptores CB1 y CB2, así como de otros receptores que responden a cannabinoideos, GPR55 y TRPV1, además de la principal enzima de síntesis diacilglicerol lipasa (DAGL) y de hidrólisis monoacilglicerol lipasa (MAGL) del 2-AG. Los estudios de las actividades

de las enzimas de síntesis (DAGL y la lisofosfatidato fosfohidrolasa (LPAP)) e hidrólisis MAGL muestran su balance en favor del incremento del 2-AG en el ROS de retinas expuestas a la luz, coincidiendo con un aumento en los niveles proteicos de los receptores CB1 y CB2. Además, en esta condición de iluminación el nivel del GPR55 disminuye, no observándose modificaciones en la expresión del TRPV1 en el ROS.

Otro hallazgo interesante de esta Tesis Doctoral lo presentan las actividades de las enzimas metabólicas en cuanto a la respuesta a las distintas formas de iluminación. Mientras la DAGL es independiente del momento en que se aplica el estímulo lumínico, la MAGL se estimula sólo cuando la luz se aplica directamente a la retina.

Dado que las actividades de DAGL y MAGL se vieron modificadas por la luz, en una segunda etapa de este trabajo de Tesis Doctoral, se evaluó si alguna de las proteínas involucradas en el proceso visual, eran responsables de la modulación de estas actividades. Los resultados sugieren el rol de la transducina y de la PDE y arrestina en la regulación de las actividades de DAGL y de MAGL, respectivamente.

Por último, y para establecer el rol de los receptores CB1 y del CB2 sobre el propio metabolismo del 2-AG, se evaluó la acción de los agonistas y antagonistas de estos receptores sobre las actividades de síntesis e hidrólisis del 2-AG. Los resultados muestran que la modulación de estos receptores genera una menor disponibilidad del 2-AG a través de la disminución en la actividad de LPAP del ROS.

Los resultados alcanzados en este trabajo de Tesis evidencian: i) la participación activa del SEC en el proceso visual y en la adaptación a la luz, ii) la modulación de la disponibilidad del 2-AG por proteínas relacionadas al fenómeno de fototransducción, e iii) la regulación del metabolismo del endocannabinoide a través de la modulación de los receptores a los que el se une con mayor afinidad.

ABSTRACT

The Endocannabinoid system (SEC) is composed of cannabinoid receptors (CB1, CB2), the ligand that binds to these receptors, 2-arachidonoyl glycerol (2-AG) and anandamide (AEA), and the enzymes responsible for the metabolism of these lipids. These molecules are involved in highly relevant intracellular mechanisms and they have neuromodulatory as well as neuroprotective functions. The study of the SEC in the retina has been recently intensified. The presence and participation of some components of SEC in the visual function have been demonstrated although their contribution to the response to light is still unknown. The entry of light into the eye is sensed by receptors, which are located in the discs of the outer segment of the photoreceptor cells. The conversion of the light signal into an electrical signal, a process called phototransduction, begins at this level.

The principal aim of this Ph. D. Thesis was to study the presence of the SEC in rod outer segments (ROS) from bovine retina photoreceptor cells and its modulation by the physiological stimulus of light. This stimulus was applied to the retina either directly or to isolated ROS from retinas kept in the dark.

In a first stage of this Ph. D. Thesis work, both the presence of SEC elements (receptors and metabolic enzymes) in ROS and how they are modulated by light were demonstrated. These results indicate the presence of CB1 and CB2 receptors as well as other receptors that respond to cannabinoids, GPR55 and TRPV1, in addition to the main enzyme of synthesis diacylglycerol lipase (DAGL) and hydrolysis monoacylglycerol lipase (MAGL) of 2-AG. The studies conducted on the activities of the biosynthetic enzymes (DAGL and lysophosphatidate

phosphohydrolase (LPAP)) and the hydrolytic enzyme (MAGL) show their balance in favor of the increase of 2-AG in ROS of light-exposed retinas, in agreement with an increase in CB1 and CB2 receptor protein levels. In addition, under this lighting condition, the level of GPR55 decreased, with no changes in the expression of TRPV1 in the ROS.

Another interesting finding from this Ph.D. Thesis concerns the activities of the metabolic enzymes relation the response to the different forms of lighting. In this respect, while DAGL is independent of the moment when the light stimulus is applied, MAGL is stimulated only when light is applied directly to the retina.

Since DAGL and MAGL activities were modified by light, during the second stage of this Ph.D. Thesis work, it was evaluated if any of the proteins involved in the visual process were responsible for the modulation of these activities. The results collected suggest the role of transducin, and PDE and arrestin in the regulation of DAGL and MAGL activities, respectively.

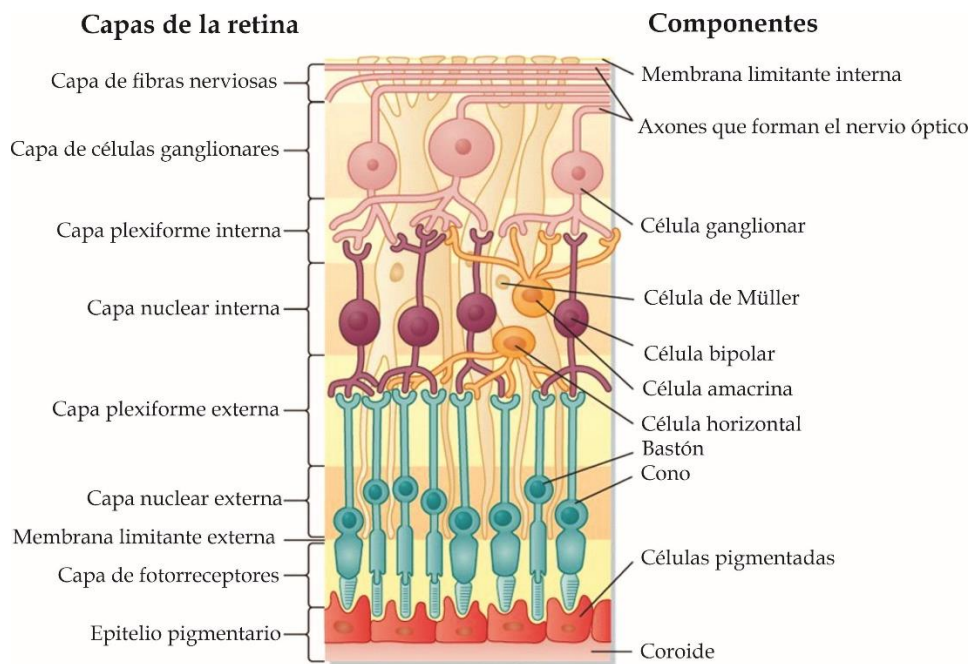
Finally, in order to determine the role of CB1 and CB2 receptors in 2-AG metabolism, the action of agonists and antagonists of these receptors on the synthesis and hydrolysis activities of 2-AG was evaluated. The results collected show that the modulation of these receptors generates a lower availability of 2-AG through the decrease in LPAP activity in ROS.

Taken together, the results from this Ph.D. work evidence: i) the active participation of the SEC in the visual process and in the adaptation to light, ii) the modulation of the availability of 2-AG by proteins related to the phenomenon of

phototransduction, and iii) the regulation of the endocannabinoid metabolism through the modulation of the receptors to which it binds with greater affinity.

INTRODUCCIÓN

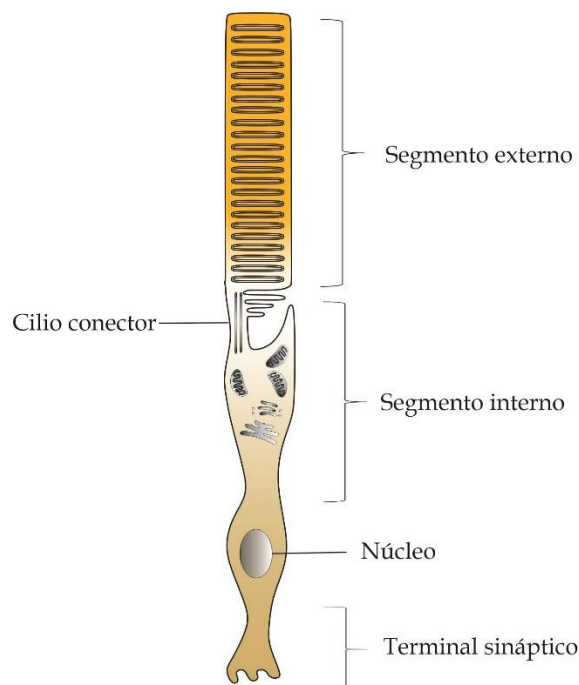
La experiencia visual se basa en la información procesada por circuitos neurales del ojo. La retina es la encargada del procesamiento y la transmisión de la señal lumínica al cerebro, y está conectada a este a través del nervio óptico. Está compuesta por seis tipos de células neuronales (fotorreceptores, horizontales, bipolares, amacrinas, ganglionares y de Müller) organizadas en ocho capas (Esquema 1). La luz atraviesa estas capas de células de la retina hasta alcanzar a las células fotorreceptoras.



Esquema 1. Organización simplificada de la retina. A la izquierda se destacan las capas que conforman la retina y a la derecha los tipos celulares (adaptado de Berne y Levy, 2009).

En vertebrados existen dos tipos de fotorreceptores, los conos y los bastones, que se distinguen por su morfología y su sensibilidad a la luz. Los bastones son alargados y su segmento externo es cilíndrico, pueden señalar la absorción de un

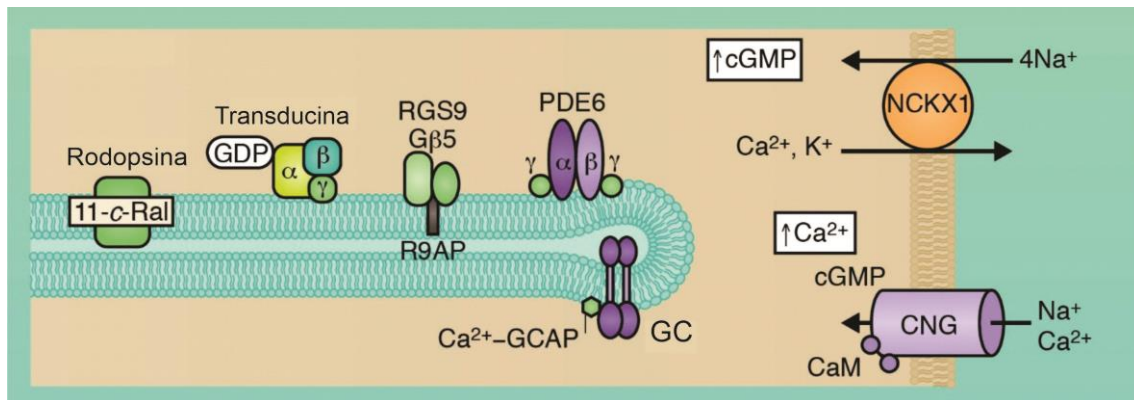
solo fotón y son responsables de la visión a bajas intensidades de luz (visión escotópica) como la visión nocturna. Los conos son más cortos y cónicos en su segmento externo, y menos sensibles a la luz, operan a intensidades lumínicas altas (visión fotópica) como la visión diurna e intervienen en la visión a color. Todos los fotorreceptores tienen una estructura común, compuesta por una región fotosensible (el segmento externo), una región central con organelas (el segmento interno), y un terminal sináptico (Esquema 2).



Esquema 2. Estructura de la célula fotorreceptora "bastón" sensible a bajas intensidades lumínicas.

El segmento externo de los bastones (ROS) está formado por discos membranosos que contienen el pigmento visual rodopsina (opsina + cromóforo 11-cis-retinal), proteínas periféricas como la transducina ($T\alpha\beta\gamma$), el complejo de proteínas reguladoras de la señalización de la proteína G (RGS9), la fosfodiesterasa

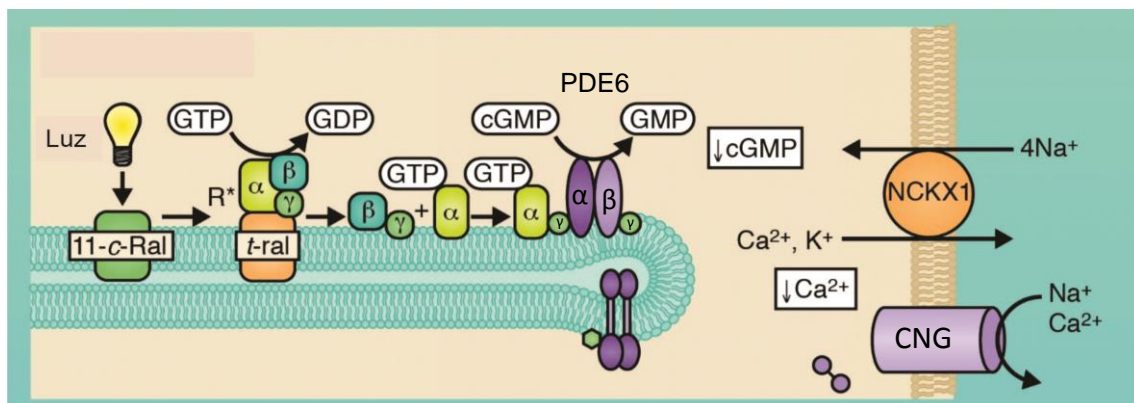
6 (PDE), el complejo de las proteínas unidoras de calcio (GCAP-Ca²⁺) unido a la guanilil ciclasa (GC), y en la membrana plasmática canales de Na⁺ y Ca²⁺ gatillados por nucleótidos cíclicos (CNG) y el intercambiador de iones, Na⁺, Ca²⁺ y K⁺ (NCKX1). El estado de estas proteínas en la condición de oscuridad se representan en el esquema 3.



Esquema 3. Proteínas de los ROS involucradas en el proceso de fototransducción en estado de oscuridad. 11-*c*-Ral: Rodopsina, GDPαβγ: transducina, RGS9: complejo de proteínas reguladoras de la señalización de la proteína G, PDE6: fofodiesterasa 6, cGMP: guanosín monofosfato cíclico, NCKX1: canal intercambiador de iones Na⁺, Ca²⁺ y K⁺, CNG: canales gatillados por nucleótidos cíclicos (Adaptado de Molday y Moritz, 2015).

En estado de fotoactivación de los ROS, un fotón de energía es absorbido por el cromóforo de la rodopsina en su configuración 11-*cis*-retinal sufriendo un cambio conformacional a todo-*trans*-retinal (rodopsina activada, R^{*}). La R^{*} desencadena una serie de reacciones, convirtiendo la señal lumínica en señal eléctrica, proceso denominado fototransducción. En este proceso la R^{*} produce el intercambio de GDP por GTP en la subunidad alfa (Tα) de la transducina. La Tα unida a GTP se disocia de las subunidades Tβγ y activa a la PDE que está compuesta por cuatro subunidades (PDEαβ₂γ). La remoción de las dos subunidades gamma activa a la PDEαβ conduciendo a la hidrólisis del GMP cíclico (GMPc). La reducción en los

niveles de GMPc causa el cierre de los canales CNG de la membrana plasmática, suprimiendo el flujo de Na^+ y Ca^{2+} (Esquema 4). Esto hiperpolariza la membrana del fotorreceptor lo que conduce a la disminución en la liberación del neurotransmisor glutamato del terminal sináptico, así iniciando una señal neural (Molday y Moritz, 2015). Esta señal es transferida a las células bipolares y de estas a las células ganglionares, cuyos axones forman el nervio óptico responsable de transferir la información visual al cerebro (Hoon y col., 2014). Esta señal se encuentra también bajo la influencia de células interneuronales como las células horizontales y las células amacrinas (Hoon y col., 2014).



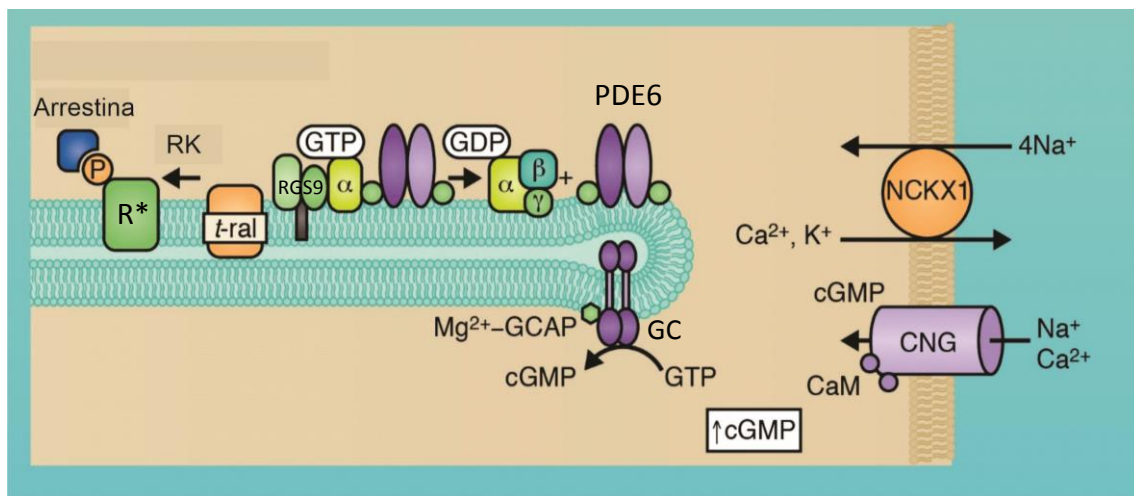
Esquema 4. Proceso de fototransducción. 11-c-Ral: rodopsina, t-ral: rodopsina activada (R^*), $\text{GDP}\alpha\beta\gamma$: transducina, $\text{GTP}\alpha$: Subunidad alfa de la transducina, cGMP: guanosín monofosfato cíclico, PDE6: fofodiesterasa 6, cGMP: guanosín monofosfato cíclico, NCKX1: canal intercambiador de iones Na^+ , Ca^{2+} y K^+ , CNG: canales gatillados por nucleótidos cíclicos (Adaptado de Molday y Moritz, 2015).

Hay dos vías principales de la salida de la señal retinal denominadas ON y OFF, y son establecidas a nivel de células bipolares. Estas células responden al glutamato a través de distintos mecanismos. Las células bipolares ON emplean receptores metabotrópicos acoplados a proteína G como el mGluR6 y las células bipolares OFF lo hacen por receptores ionotrópicos de la variedad AMPA-kainato

(AMPA). En oscuridad, las células fotorreceptoras se encuentran despolarizadas favoreciendo la liberación de glutamato, este neurotransmisor inhibe (hiperpolariza) las células bipolares ON y estimula (despolariza) las células bipolares OFF. Por otro lado, en presencia de luz, las células fotorreceptoras se hiperpolarizan disminuyendo la liberación de glutamato. Esto estimula (despolariza) las células bipolares ON, mientras que, las células bipolares OFF son inhibidas (hiperpolarizadas). Las células bipolares ON excitan a las células ganglionares ON, mientras que las células bipolares OFF excitan a las células ganglionares OFF (Meister y Tessier-Lavigne, 2012).

La resolución temporal de la visión requiere una rápida inactivación de los componentes de la cascada de la fototransducción de forma tal que la célula pueda responder rápidamente al siguiente evento lumínico (Burns y Pugh, 2010). Distintos procesos conducen a la finalización de la respuesta a la luz. Uno de ellos es la disminución en la concentración de Ca^{2+} citoplasmática del ROS, debido a que el cierre de los canales CNG evita la entrada del ión mientras que el NCKX1 continúa promoviendo la salida del mismo (Molday y Moritz, 2015). Otro hecho fundamental es la desactivación de la R^* por fosforilación, acción que es catalizada por la rodopsina quinasa (RK), y la posterior unión de la arrestina (Lamb y Pugh, 2004). Esto previene la activación de la transducina (Arshavsky y col., 2002). La tasa de fosforilación de la R^* es regulada por la recoverina, esta proteína con calcio unido interactúa con la RK formando un complejo y bloqueando su capacidad fosforilante. La disminución de Ca^{2+} inducida por la luz libera a la RK del complejo, aumentando así la fosforilación de la R^* y apagando la señal (Makino y col., 2004). También

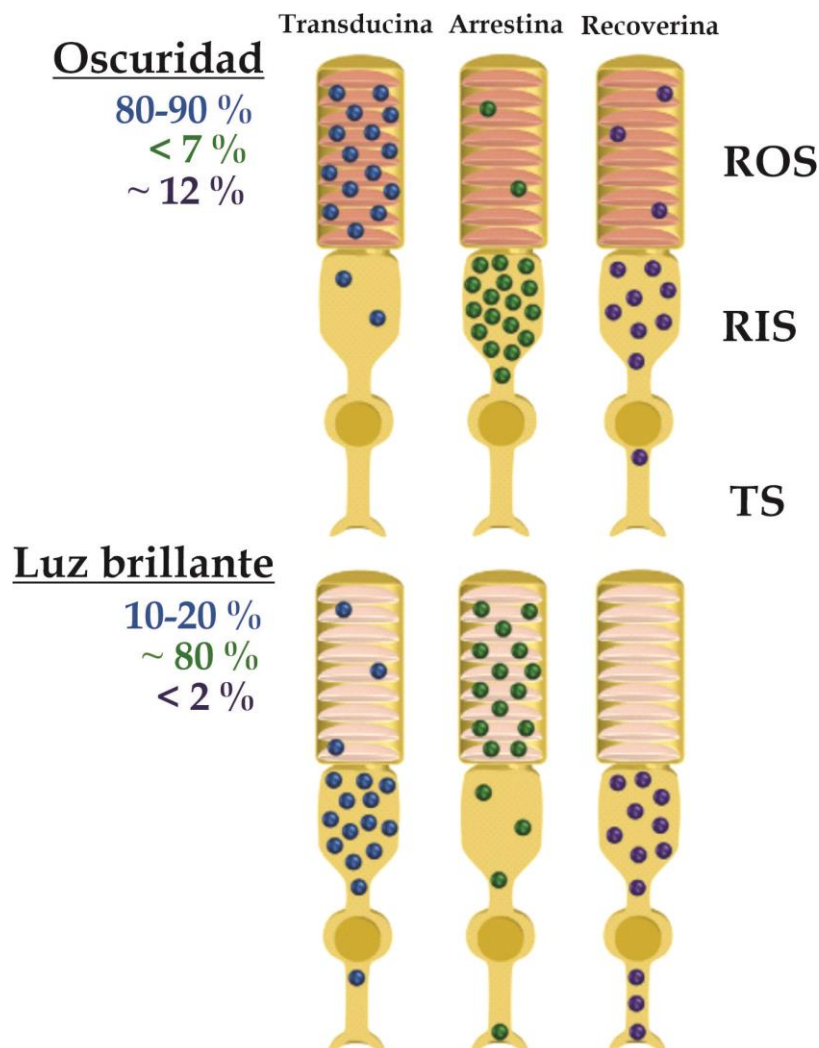
contribuye a la finalización del proceso lumínico la hidrólisis del GTP unido a $T\alpha$, esto permite el ensamblaje de las cuatro subunidades de la PDE retornándola a su estado inactivo (Arshavsky y Wensel, 2013). La $T\alpha$ presenta una actividad GTPasa baja, que se ve aumentada por la unión del complejo RGS9, conformado por la RGS9-1, la $G\beta 5$ y la proteína de anclaje a la membrana R9AP (Pugh, 2006, Wensel, 2008). Por otro lado, los niveles de GMPc son restablecidos por la acción de la GC, enzima que es estimulada por las GCAP- Ca^{2+} en ausencia del ión (Baehr y col., 2007, Dizhoor y col., 1995, Palczewski y col., 1994) (Esquema 5). Finalmente, cuando los niveles de GMPc se restablecen, los canales CNG se abren y retorna el fotorreceptor a un estado despolarizado (Molday y Moritz, 2015).



Esquema 5. Terminación de la fototransducción, restablecimiento al estado de oscuridad. t-ral: rodopsina activada (R^*), RK: rodopsina quinasa, $GDP\alpha\beta\gamma$: transducina, RGS9: complejo de proteínas reguladoras de la señalización de la proteína G, GCAPs: proteínas unidoras de calcio, GC: guanilil ciclasa, PDE6: fofodiesterasa 6, cGMP: guanosín monofosfato cíclico, NCKX1: canal intercambiador de iones Na^+ , Ca^{2+} y K^+ , CNG: canales gatillados por nucleótidos cíclicos (Adaptado de Molday y Moritz, 2015).

Un mecanismo interesante por el cual los fotorreceptores se adaptan a la luz, es la translocación masiva y reversible entre el segmento externo y el resto de la célula de tres proteínas claves en el proceso visual: la transducina, la arrestina y la

recoverina (Calvert y col., 2006). En condiciones de oscuridad la arrestina predomina en el segmento interno de los bastones (RIS) y frente al estímulo lumínico se desplaza hacia el ROS, mientras que las subunidades T α y T β γ de la transducina lo hacen en la dirección opuesta (Lobanova y col., 2007), y la recoverina migra hacia el terminal sináptico (Strissel y col., 2005) (Esquema 6).



Esquema 6. Translocación de las proteínas en los bastones por exposición a luz brillante. El esquema ilustra la distribución de la transducina, arrestina y recoverina de bastones en condiciones de oscuridad y de luz. Los números de la izquierda representan los porcentajes en que se encuentran cada una de las proteínas en el ROS. El color de cada número representa a una proteína en particular. Las abreviaturas de la derecha corresponden a los diferentes compartimentos de los bastones. ROS: segmento externo, RIS: segmento interno y TS: terminal sináptico. (Adaptado de Calvert y col., 2006).

Las membranas del ROS están constituidas por un 50 % de proteínas y un 50 % de lípidos (Fliesler y Anderson, 1983). La rodopsina representa el 80-85 % (p / p) de las proteínas totales (Smith y Litman, 1982, Papermaster y Dreyer, 1974, Daemen, 1973) correspondiendo el porcentaje restante a otras proteínas, entre ellas, las implicadas en la fototransducción. Los fosfolípidos constitutivos de las membranas del ROS son mayoritariamente fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilcolina (PC) (~80 %), y fosfatidilserina (PS) (~15 %) mientras que la esfingomielina, el fosfatidilinositol (PI) y el ácido fosfatídico (PA) se encuentran cada uno de ellos en cantidades menores al 1 % (Giusto y col., 2010, Yuan y col., 1998, Anderson, 1982).

Resultados de diferentes grupos de investigación y del nuestro han demostrado que los fosfolípidos constitutivos de estas membranas son metabólicamente activos y que ellos junto con las enzimas responsables de su metabolización están implicados en la generación de mediadores fisiológicos en estrecha relación con la transducción del estímulo visual (Giusto y col., 2010, Hessel y col., 2001, Giusto y col., 2000, Ghalayini y Anderson, 1984). En este contexto se ha evidenciado que las actividades de muchas de las enzimas involucradas en el recambio de los fosfolípidos del ROS tales como fosfolipasa C (PLC), fosfolipasa A2 (PLA2), fosfatidiletanolamina N-metil transferasa (PEMT), diacilglicerol quinasa (DAGK), lípido fosfato fosfatasas (LPP), diacilglicerol lipasa (DAGL) acoplada a LPP, fosfatidilinositol sintasa (PI sintasa), fosfoinosítido-3-quinasa (PI3K) y fosfolipasa D (PLD) son moduladas por luz (Rajala y col., 2002, Giusto y col., 2000, Ghalayini y col., 1998, Ghalayini y Anderson, 1995, Ghalayini y Anderson, 1984). Nuestro grupo de trabajo ha demostrado además que la modulación por luz de PLD

y DAGK implica la movilización desde el ROS hacia el RIS de RhoA, una proteína G pequeña que activa a la enzima PLD (Salvador y Giusto, 2006) y la movilización en sentido opuesto de la DAGK ϵ (Natalini y col., 2013), disminuyendo y aumentando la actividad de PLD y DAGK ϵ en ROS, respectivamente.

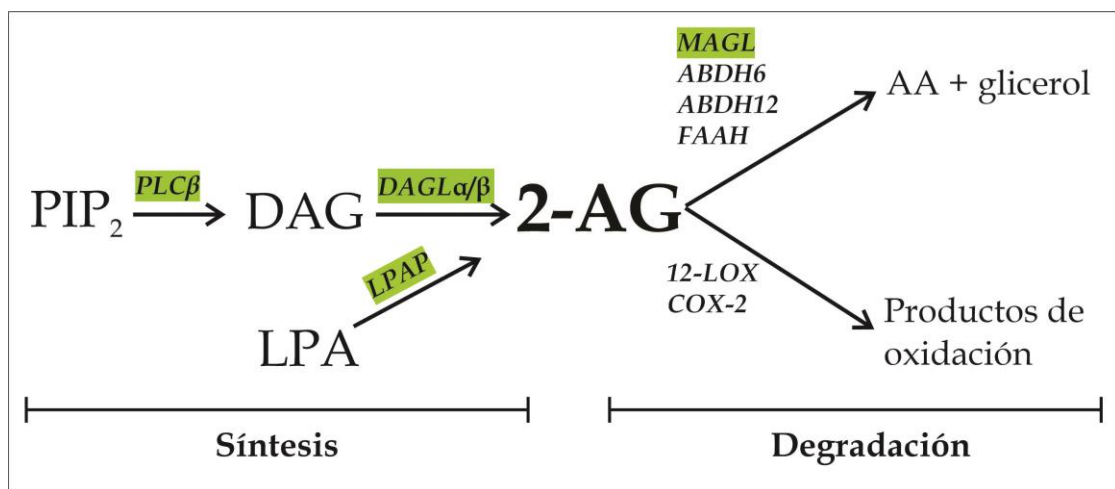
El sistema cannabinoide endógeno o endocannabinoide (SEC) está compuesto por receptores de membrana, ligandos endógenos (endocannabinoides, EC), que incluyen una variedad de amidas, ésteres y otros derivados del ácido araquidónico, y las enzimas responsables del metabolismo de estos ligandos. Los EC son moléculas de naturaleza lipídica siendo los más estudiados el 2-araquidonoilglicerol (2-AG) y la araquidonoil etanolamida (Anandamida, AEA). La principal vía de síntesis del 2-AG involucra la hidrólisis del diacilglicerol (DAG) por acción de la enzima diacilglicerol lipasa (DAGL). Esta enzima presenta dos isoformas, DAGL α y DAGL β , siendo la isoforma DAGL α la principal enzima involucrada en la síntesis de este EC (Bisogno y col., 2003). El DAG, sustrato que da origen al 2-AG, proviene de la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) por acción de una fosfolipasa C (PLC β 1) siendo este el mecanismo más aceptado, debido a que la activación de los receptores metabotrópicos involucrados en la formación del 2-AG están acoplados a las vías de la PLC y de la DAGL (Stella y col., 1997) (Esquema 7). Otra vía que lleva a la formación del 2-AG es por la acción de la lisofosfatidato fosfohidrolasa (LPAP) sobre el 2-araquidonoil lisofosfatidato (2-araquidonoil-LPA) (Nakane y col., 2002) (Esquema 7). Otra ruta alternativa de formación del 2-AG es la que emplea como sustrato un DAG proveniente de la hidrólisis del ácido fosfatídico (PA) por la acción de una PA fosfohidrolasa

dependiente de calcio y de magnesio (Carrier y col., 2004, Bisogno y col. 1999). Una de las vías en la formación de este endocannabinoide, que presenta menos aportes bibliográficos, es la que involucra a la fosfolipasa A de tipo 1 (PLA1) que actuando sobre el fosfatidilinositol (PI) genera lisofosfatidil inositol. Este puede ser hidrolizado por una lisofosfolipasa C (liso-PLC) produciéndose 2-AG (Tsutsumi y col., 1994, Ueda y col., 1993).

La principal vía de síntesis de la AEA es a partir de una fosfolipasa D (PLD) denominada N-araquidonoil-fosfatidiletanolamina fosfolipasa D (NAPE-PLD) sobre el precursor fosfolipídico N-araquidonoil-fosfatidiletanolamina (NAPE) (Okamoto y col., 2004, Cadas y col., 1996, Di Marzo y col., 1994). Sin embargo, hay otras rutas paralelas de síntesis de AEA donde actúan diferentes enzimas (Liu y col., 2006, Simón y Cravatt, 2006, Sun y col. 2004).

La degradación del 2-AG puede producirse a través de dos vías diferentes. Una de ellas es por hidrólisis generándose ácido araquidónico y glicerol. Esta acción es realizada principalmente por la monoacilglicerol lipasa (MAGL), quien es la responsable de hidrolizar al 2-AG en un 85 % en el sistema nervioso (Pascual y col., 2013, Blankman y col., 2007). Otras enzimas involucradas en esta actividad catalítica son la serina hidrolasa con dominio α/β 6 (ABDH6), la serina hidrolasa con dominio α/β 12 (ABDH12) y la ácido graso amido hidrolasa (FAAH). En el sistema nervioso ABDH6 y ABDH12 contribuyen en la hidrólisis del 2-AG en un porcentaje menor al 10 % (Pascual y col., 2013, Savinainen y col., 2012, Schlosburg y col., 2010, Dinh y col., 2004, Dinh y col., 2002), mientras que la FAAH lo hace en un porcentaje que oscila entre el 15 % y el 25 % (Pascual y col., 2013, Blankman y col., 2007). La otra

vía por la que el 2-AG puede ser catabolizado es la de oxidación, a través de las enzimas ciclooxigenasa 2 (COX-2) y/o 12-lipooxigenasa (12-LOX) (Moody y col., 2001, Kozak y col., 2000) generándose productos de oxidación. La AEA es degradada principalmente por la FAAH, produciéndose ácido araquidónico y etanolamina (Maurelli y col., 1995). Al igual que el 2-AG, la AEA también puede ser metabolizada por la COX-2 (Woodward y col., 2008) (Esquema 7).



Esquema 7. Principales vías de síntesis y degradación del 2-araquidonoilglicerol (2-AG). Las enzimas involucradas en el metabolismo del 2-AG estudiadas en esta Tesis están resaltadas en verde. PIP₂: fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato, DAG: diacilglicerol, LPA: ácido lisofosfatídico, PLCβ: fosfolipasa C beta, DAGLα/β: diacilglicerol lipasa alfa o beta, LPAP: lisofosfatidato fosfohidrolasa, MAGL: monoacilglicerol lipasa, ABDH6: serina hidrolasa con dominio α/β 6, ABDH12: serina hidrolasa con dominio α/β 12, FAAH: ácido graso amido hidrolasa, COX-2: ciclooxigenasa-2; 12-LOX: 12-lipooxigenasa; AA: ácido araquidónico.

Los EC pueden actuar sobre los receptores de la misma célula en la que se formaron o pueden ser liberados al espacio extracelular donde se unen a ciertas proteínas de transporte y son llevados hasta blancos más distantes (Piomelli, 2003). Los receptores a los cuales se unen los EC son denominados receptores cannabinoides, estos también son activados por el Δ⁹-tetrahidrocannabinol (THC), el mayor componente psicotrópico de las flores de la planta *Cannabis sativa*. El

receptor cannabinoide 1 (CB1) fue el primero en ser descubierto en el cerebro (Matsuda y col., 1990) y es abundante en el sistema nervioso central (SNC), particularmente en el córtex, ganglios basales, hipocampo y cerebelo (Mackie, 2005). El segundo fue el receptor cannabinoide 2 (CB2) caracterizado en células del sistema inmune (Munro y col., 1993). Los receptores CB1 y CB2 son miembros de la superfamilia de receptores de siete segmentos transmembrana y poseen dominios que pueden asociarse con proteínas G de la familia Gi/o. Los receptores cannabinoideos están involucrados en distintas vías de transducción de señales. Una de las más estudiadas en tejidos y en células, es aquella que comprende la activación de Gi con la consecuente inhibición de la adenilil ciclasa (AC). La inhibición de la producción de adenosín monofosfato cíclico (AMPC) es una respuesta característica de agonistas cannabinoideos sobre el receptor CB1 en tejido cerebral (Childers y col., 1994, Bidaut-Russell y col., 1991) y en líneas celulares que expresan este receptor (Felder y col., 1993). Sin embargo, los receptores cannabinoideos pueden estimular la AC por la vía de señalización Gs en algunos modelos experimentales (Calandra y col., 1999, Glass y col., 1997, Maneuf y Brotchie, 1997). Existe evidencia que relaciona a los receptores cannabinoideos con el flujo de iones Ca^{2+} y con la mayor actividad de las enzimas fosfolipasas A y C. Además, la estimulación de estos receptores conduce a la fosforilación y consecuente activación de la proteína quinasa activada por mitógenos p42/p44 (MAPK) y de la quinasa Jun N-terminal (JNK) como vías de señalización que regulan factores de transcripción nuclear. Se ha reportado que el receptor CB1 puede regular canales que permean Ca^{2+} y K^{+} probablemente por activación de la proteína Go (Howlett, 2005). También se ha demostrado la

participación de la β -arrestina-1 y de la β -arrestina-2 en la señalización de CB1 y CB2 (Ibsen y col., 2019). El reclutamiento de β -arrestina-2 por la activación de los receptores CB1 y CB2 podría participar en la desensibilización e internalización de los mismos (Chen y col., 2014, Daigle y col., 2008).

Los EC pueden activar a otros receptores distintos a los receptores CB1 y CB2. Uno de ellos es el receptor de potencial transitorio vanilloide tipo 1 (TRPV1), el primer receptor cannabinoide ionotrópico identificado, que puede ser activado por AEA y 2-AG (Zygmunt y col., 2013, Smart y col., 2000). Este receptor es un canal catiónico perteneciente a la familia de receptores de potencial transitorio (TRP) que están involucrados en la homeostasis de Ca^{2+} en las células (Van der Stelt y Di Marzo, 2005). El TRPV1 es homólogo de los canales de potencial de receptor transitorio (TRP) descritos en los fotorreceptores de *Drosophila* los que son activados por luz (Leung y col., 2008, Minke y col., 1982, Montell y col., 1985). En relación al receptor TRPV1 se observó que las ondas (*a-wave* y *b-wave*) en condiciones fotópicas y escotópicas son indistinguibles en ratones *knock out* para éste respecto a los animales controles (Shen y col., 2009).

Otros receptores que también interactúan con ligandos cannabinoides sintéticos, EC y fitocannabinoides son el receptor GPR55 y los receptores nucleares PPAR (Ryberg y col., 2007, Burstein, 2005). El GPR55 forma heterodímeros con los receptores CB1 y CB2, encontrándose estas conformaciones expresadas en regiones específicas del SNC (Martinez-Pinilla y col., 2020, Balenga y col., 2014, Martinez-Pinilla y col., 2014).

Uno de los aspectos más importantes estudiados de los EC es su capacidad para actuar como mensajeros retrógrados ya que se unen a receptores presinápticos, modulando la liberación de una gran variedad de neurotransmisores (Hashimoto et al., 2007, Schlicker y Kathmann, 2001). Los EC son sintetizados y liberados al medio extracelular desde neuronas postsinápticas, y ejercen la mayoría de sus acciones uniéndose a los receptores CB1 que se encuentran presentes en el terminal presináptico (Schlicker y Kathmann, 2001). La liberación de los EC se desencadena por estímulos como la despolarización de la membrana postsináptica en la que se ven involucrados canales de Ca^{2+} , la activación de receptores acoplados a la proteína Gq, la activación de receptores asistidos por Ca^{2+} , la elevación de los niveles de Ca^{2+} sumada a la activación de receptores y otros eventos desencadenados por la actividad sináptica (Hashimoto et al. 2007). En la actualidad se cree que el tipo de regulación rápida y controlada que ejercen los EC como moduladores retrógrados de la neurotransmisión es mediada preferentemente por el 2-AG (Piomelli, 2014).

Si bien la señalización retrógrada sigue siendo el principal mecanismo por el cual los EC regulan la función sináptica, se cuenta con evidencia que indica que también podrían actuar de manera autócrina, por unión a los receptores vanilloides TRPV1 o a los receptores CB1 localizados en los terminales postsinápticos, o modulando indirectamente las funciones pre y postsinápticas por señalización a través de astrocitos (Castillo et al., 2012).

La importancia del SEC en la regulación de la neurotransmisión en el sistema nervioso central (SNC) ha sido ampliamente demostrada (Zou y Kumar, 2018),

razón por la cual en los últimos años se ha comenzado a estudiar este sistema en el tejido ocular. Los aportes bibliográficos que dan cuenta del rol del SEC en este tejido y considerando que la retina es una extensión del SNC es lógico inferir que el SEC podría estar implicado en la respuesta visual.

La presencia de algunos de los elementos del SEC ha sido demostrada en el tejido ocular de diferentes especies, desde peces hasta primates (Bouchard y col., 2016, Cottone y col., 2013, Yazulla, 2008, Lograno y Romano, 2004). En relación a los EC, se encontró que los niveles del 2-AG son significativamente más altos que los de la AEA en retinas humanas y bovinas (Chen y col., 2005, Bisogno y col., 1999). Por otra parte, se ha demostrado la presencia de las enzimas encargadas de la síntesis y de la degradación del 2-AG en retina. La DAGL y la MAGL se expresan en retina de rata y ratones (Maccarone y col., 2016, Cecyre y col., 2014, Hu y col., 2010). En retina de ratones la DAGL α se detectó en células bipolares tipo 1 OFF contigua a los terminales sinápticos de los conos que expresan CB1, mientras que la DAGL β solo se encontró en los vasos sanguíneos retinales. La presencia de MAGL se describió en los ROS y en los segmentos externos de los conos (COS), en la capa plexiforme externa (OPL), observándose su máxima expresión en la capa plexiforme interna (IPL) (Hu y col., 2010).

Se ha establecido que el SEC tiene un rol en el desarrollo del cerebro, ya que la exposición a cannabinoides durante el desarrollo genera alteraciones neurofuncionales (Fride, 2008). En este sentido los trabajos de Cécyre y col. (2014), donde se evalúa la presencia y la localización de la DAGL α y de la MAGL en retina de rata durante el desarrollo postnatal, demuestran que la DAGL α está altamente

expresada en células fotorreceptores, horizontales, amacrinas y ganglionares, a lo largo del desarrollo; mientras que la MAGL aparece en etapas tardías del desarrollo y su presencia está limitada a células amacrinas y de Müller (Cecyre y col., 2014).

Los receptores cannabinoides también se expresan en diferentes capas de la retina de distintas especies (Bouskila y col., 2012, Lopez y col., 2011, Straiker y col., 1999, Yazulla y col., 1999). El receptor CB1 fue encontrado en retinas de mono Rhesus, ratones, rata, pollo, pez dorado y salamandra. Este receptor fue detectado en la OPL, localizado en COS y ROS, y también en el soma de las células amacrinas y en las células ganglionares. Una baja expresión del mismo fue observada en los segmentos externos e internos de los fotorreceptores de mono, rata, ratón y pollo (Straiker y col., 1999). Yazulla y col. (1999) también estudiaron la localización del receptor CB1 en retina de rata, sus hallazgos indican una extensa distribución en las células bipolares de bastones, en un subtipo de células amacrinas gabaérgicas y en células horizontales, como también en la IPL (Yazulla y col., 1999). Asimismo los estudios de Bouskila y col. (2012) empleando retinas de monos *Chlorocebus sabeus* (mono vervet) demostraron la expresión del receptor CB1 en fotorreceptores, OPL, capa nuclear interna (INL), IPL y capa de células ganglionares retinales (RGCL). Estos autores observaron además una localización preferencial del receptor en conos de la retina central, y una ligera expresión en COS y ROS en la OPL (Bouskila y col., 2012).

En lo que respecta al receptor CB2, su distribución fue estudiada en retina de rata adulta, detectándose su presencia en el epitelio pigmentario, en el RIS de

fotorreceptores, en células amacrinas y en células horizontales; además de observarse en la RGCL y en la IPL (Lopez y col., 2011).

La expresión de otros receptores que responden a cannabinoides, como los receptores GPR55 y TRPV1, también se ha descrito en retina (Bouskila y col., 2013, Zimov y col., 2004). En retinas de mono vervet se observó la localización del receptor GPR55 en la capa de fotorreceptores, con mayor predominio en RIS, y colocalizando con rodopsina en los bastones (Bouskila y col., 2013). Estudios en retinas de *Brachydanio rerio* (pez Cebra) y de *Carassius auratus* (pez Dorado), ubican al TRPV1 sólo en la OPL, específicamente en los terminales sinápticos de conos y bastones (Zimov y col., 2004).

Debido a la presencia del SEC en la retina es que se ha evaluado si este sistema tiene un rol funcional en la visión, analizando los registros de electroretinogramas (ERG) en respuesta a la estimulación por luz. Los registros de los ERG son generados principalmente por la respuesta de los fotorreceptores (conos y bastones), del complejo de células bipolares ON y de células de Müller. Los ERG evalúan dos condiciones: la fotópica de adaptación a luz, respuesta mediada por los conos, y la escotópica de adaptación a la oscuridad, donde se evalúa la funcionalidad de los bastones. Estas condiciones son definidas de acuerdo a la intensidad lumínica del flash, medido en candelas por segundo por metro (McCulloch y col., 2015). Dos principales componentes son observados en un ERG: un componente electronegativo llamado *a-wave* generado por la hiperpolarización de los fotorreceptores, seguido de un componente electropositivo llamado *b-wave*

que refleja la despolarización del complejo de células bipolares ON y de Müller (Viswanathan y col., 1999).

El mono vervet fue una de las especies empleadas para estudiar el rol de los receptores cannabinoides en la función retinal normal. Para esto se evaluó por ERG, los cambios en la actividad neural empleando antagonistas de los receptores CB1 y CB2 (AM251 y AM630, respectivamente) que fueron administrados por inyección intravítrea. El antagonista del CB1 incrementó la amplitud de *a-wave* en condiciones fotópicas, mientras que el antagonista CB2 incrementó la amplitud de *a-* y *b-waves*. En condiciones escotópicas, ambos antagonistas incrementaron la amplitud de *b-wave* no modificándose la amplitud de *a-wave*. Estas observaciones indican que ambos receptores cumplen un rol en la funcionalidad retinal (Bouskila y col., 2016). Otros estudios conducentes a evaluar la función del SEC en la visión se realizaron empleando ratones *knock out* para el receptor CB1 o para el receptor CB2. Estos trabajos revelan que solamente en ratones carentes de CB2 en condiciones fotópicas las amplitudes de *b-wave* requieren de un tiempo mayor de adaptación a la luz para alcanzar valores del control. Por otro lado, en condiciones escotópicas las amplitudes de la *a-wave* se vieron incrementadas en ratones carentes del receptor CB2, mientras que no se modificaron en ratones con receptor CB1 ausente. Esto indica que el receptor CB2 estaría particularmente involucrado en la respuesta a la luz, y que ambos receptores podrían tener diferentes roles en el procesamiento visual (Cecyre y col., 2013).

El rol funcional del GPR55 en el proceso visual también ha sido estudiado. En monos vervet, se observó que el estímulo de este receptor, por el agonista

lisofosfatidilglucósido (LGP), produce un incremento en la amplitud de la onda *b-wave* del ERG en condiciones escotópicas, mientras que su bloqueo, por el antagonista CID16020046, disminuye la amplitud de esta onda. Por el contrario, en condiciones fotópicas los parámetros analizados de los ERG no fueron afectados por estas drogas. Todo esto lleva a concluir que el GPR55 cumple un rol funcional en la visión escotópica (Bouskila y col., 2016).

Los receptores cannabinoides también se encuentran involucrados en la regulación de los canales iónicos de las células de la retina (Fan y col., 2003, Straiker y Sullivan, 2003). Fan y Yazulla han observado que WIN 55,212-1 (WIN), un agonista de receptores cannabinoides, modula de manera dependiente de la concentración, las corrientes modificadas por voltaje de iones Ca^{2+} , K^{+} y Cl^{-} en el segmento interno de conos del pez dorado (*Carassius auratus*). Concentraciones de WIN menores a $1\mu\text{M}$ incrementaron las corrientes de Ca^{2+} , K^{+} y Cl^{-} , efecto en el que estaría involucrada una proteína Gs; concentraciones de WIN mayores a $1\mu\text{M}$ suprimieron estas corrientes, relacionándose la acción a una proteína Gi/o. Todos los efectos observados por WIN fueron bloqueados por el antagonista del receptor CB1 (SR141716A) (Fan y col., 2003). En el mismo modelo, también se observó que las corrientes de K^{+} de las células bipolares ON de la retina fueron inhibidas por dos agonistas del receptor CB1 (WIN y CP54490), y dicho efecto fue bloqueado por el antagonista del receptor CB1 (SR141716A). Estos resultados estarían relacionados con el hecho de que la expresión del receptor CB1 es abundante en las membranas de los terminales sinápticos de las células bipolares ON (Yazulla y col., 2000). Otros trabajos reportan que la activación del receptor CB1 presente en los terminales

sinápticos de los fotorreceptores y en las células bipolares de salamandra (*Ambystoma tigrinus*) modulan diferencialmente las corrientes de Ca^{2+} y K^{+} (Straiker y col., 2003, Straiker y col., 1999). WIN incrementó la corriente de Ca^{2+} en los bastones y la disminuyó en los conos; y suprimió la corriente de K^{+} en ambos fotorreceptores (Straiker y Sullivan, 2003). La corriente de Ca^{2+} fue inhibida por este agonista en células bipolares, y las de Ca^{2+} y K^{+} en células ganglionares (Zhang y col., 2013, Lalonde y col., 2006, Straiker y col., 1999). Sin embargo, el empleo de antagonistas de los receptores CB1 y CB2, demostró que el efecto de WIN en la modulación de la corriente de K^{+} de las células ganglionares es independiente de la activación de estos receptores (Zhang y col., 2013).

La retina es parte del SNC y como tal puede ser afectada por distintos procesos que llevan a su neurodegeneración. En este sentido se han explorado diferentes estrategias neuroprotectoras para preservar a la retina de procesos degenerativos que la afectan, como lo son el glaucoma, la retinopatía diabética, la degeneración macular relacionada a la edad y la retinitis pigmentosa (Rapino y col., 2018). En la degeneración macular relacionada a la edad y en otras enfermedades retinales, se ven afectados los fotorreceptores tanto en número como en funcionalidad (Curcio, 2001). Modelos animales sometidos a daño retinal por exposición a alta intensidad lumínica han sido empleados para dilucidar los mecanismos que subyacen a la disfunción retinal en varias enfermedades oculares. Está ampliamente descrito el rol del SEC cumpliendo funciones neuroprotectoras en diversos procesos neurodegenerativos que afectan al SNC (Pascual y col., 2014, Harvey y col., 2012, Scotter y col., 2010, Fernandez-Ruiz y col., 2000) como también

en modelos de neurodegeneración retinal (Araujo y col., 2017, Kokona y Thermos, 2015, Slusar y col., 2013, Yazulla, 2008, Nucci y col., 2007). Algunos datos en lo que respecta al SEC y al daño retinal son aportados por la literatura. Estudios de las enzimas relacionadas al metabolismo de los EC, y de los receptores a los que ellos se unen fueron realizados en ratas albinas sometidas a daño retinal inducido por luz. Estos trabajos mostraron que tanto los niveles de ARN mensajero (ARNm) como el nivel proteico de las enzimas de síntesis (DAGL y NAPE-PLD) y de hidrólisis (MAGL y FAAH) del 2-AG y de la AEA no se veían modificados frente a la injuria. Sin embargo, el ARNm y la expresión proteica de los receptores CB1 y CB2 se vieron incrementados (Maccarone y col., 2016). En lo que respecta a estudios de la funcionalidad de los receptores que responden a cannabinoides en modelos de injuria retinal inducido por exposición a la luz se observó que el bloqueo selectivo de los receptores CB1 y CB2 era capaz de reducir la muerte de fotorreceptores preservando la morfología y la funcionalidad celular, demostrando además una mayor participación del receptor CB2 en el efecto (Maccarone y col., 2016). Por otra parte, Imamura y col. (2017) utilizando el mismo modelo de daño retinal en ratones y en otro modelo de daño donde la línea celular de conos 661 W era sometida a 2500 luxes durante 24 horas, reportaron un incremento en el nivel de expresión del receptor CB1 y demostraron que el bloqueo de este receptor por el antagonista Rimonabant anulaba el daño neural y el deterioro funcional de la retina generado por la luz (Imamura y col., 2017). Estos mismos autores reportaron una disminución en los niveles del receptor CB2 en los dos modelos anteriores y observaron que el agonista del receptor CB2 (HU-308) tiene un efecto protector

frente al daño inducido por luz en células 661 W, efecto que fue atenuado por el antagonista del receptor CB2 (SR144528) (Imamura y col., 2018). En conclusión, los trabajos de Imamura demuestran que el receptor CB2 está involucrado en la protección retinal al daño inducido por luz.

En otros modelos de injuria retinal donde el daño es generado por isquemia, se observó una disminución en los niveles endógenos de AEA al igual que en la expresión de los receptores CB1 y TRPV1 (Nucci y col., 2007). En el mismo trabajo se reportó que la inhibición de la FAAH, la enzima encargada de la degradación de la AEA, minimizó el daño retinal observado en el modelo isquémico; y que la Metanandamida (un análogo de la AEA) redujo la pérdida de células en la RGCL, efectos que desaparecieron al antagonizar los receptores CB1 o TRPV1 (Nucci y col., 2007). Resultados similares fueron encontrados en otro modelo de daño generado por axotomía del nervio óptico en rata, donde la inhibición de la FAAH por URB597 incrementó la supervivencia de las células ganglionares de la retina, efecto que era mediado principalmente por el receptor CB1 (Slusar y col., 2013). Al receptor CB1 también se lo relacionó con la neuroprotección de las neuronas amacrinias de retina de rata cuando son sometidas *in vivo* a excitotoxicidad por AMPA (Kokona y Thermos, 2015).

Lo detallado precedentemente respecto al SEC en la retina indica que algunos elementos de este sistema se encuentran regionalizados en ciertos tipos neuronales, que la administración de cannabinoides exógenos alteraría varias funciones de la retina, que los cannabinoides modularían canales iónicos y otras corrientes de membrana de alta relevancia en el proceso de respuesta a la luz y que además estas

moléculas cumplirían un rol protector frente a la neurodegeneración retiniana inducida por luz. Todo esto sugiere un papel sustancial del sistema cannabinoide en la fisiología de la retina, y tal vez en la visión en general. Sin embargo, al inicio de este trabajo nada se conocía sobre el metabolismo de los cannabinoides endógenos ni de su modulación por luz específicamente en el segmento externo de los bastones, objetivos cubiertos en esta Tesis.

OBJETIVOS GENERALES

Evaluar en la fracción fotosensible de la retina de mamífero (células fotorreceptoras): **1)** la presencia, la actividad y la regulación por estímulo lumínico de los distintos elementos del sistema cannabinoide: las enzimas involucradas en el metabolismo del 2-AG y los receptores a los que los cannabinoides se unen, **2)** la biodisponibilidad de 2-AG en relación con las proteínas involucradas en el proceso visual y **3)** la modulación farmacológica de la biodisponibilidad de 2-AG por efecto de agonistas y de antagonistas de los receptores a los que los cannabinoides se unen con mayor afinidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

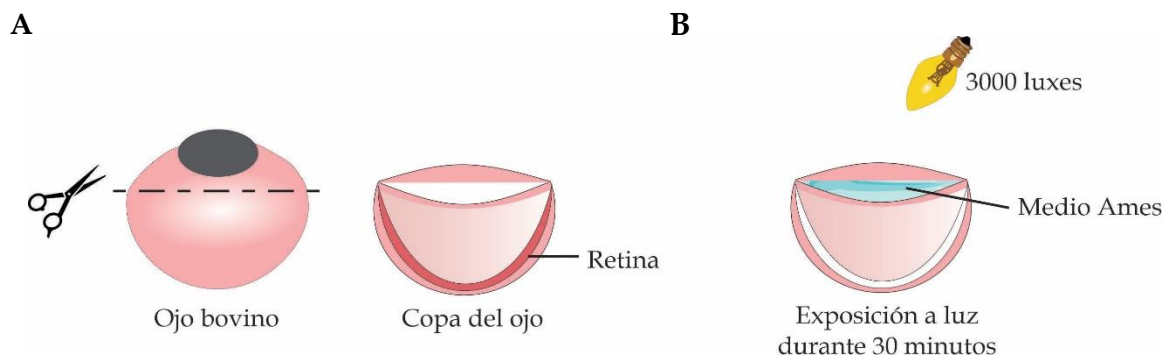
1. Modelo experimental

La expresión de las enzimas y receptores relacionados con el sistema cannabinoide, y las actividades enzimáticas involucradas en el metabolismo del 2-AG fueron analizadas en los segmentos externos de células fotorreceptoras. Los ROS fueron obtenidos a partir de retinas mantenidas en oscuridad o estimuladas por luz.

1.1 Exposición de la copa del ojo a la luz y obtención de los segmentos externos de bastones provenientes de retinas mantenidos en oscuridad (ROS O) y de retinas expuestas a luz (ROS L)

Para desarrollar este trabajo de Tesis se emplearon ojos bovinos donados por el frigorífico "Hilario Viñuela" de la ciudad de Bahía Blanca. Éstos fueron colocados en hielo inmediatamente después del sacrificio del animal y mantenidos en oscuridad durante 2 horas hasta su utilización. Los ojos fueron seccionados con bisturí, y la córnea, el lente y el humor acuoso removidos bajo luz roja para evitar el blanqueamiento de la rodopsina (Esquema 8 A). Luego, la copa del ojo (conteniendo la retina) fue mantenida en oscuridad (condición oscuridad) o expuesta a 3000 luxes (condición luz) durante 30 minutos, a temperatura ambiente (Esquema 8 B). Con el propósito de preservar el tejido durante el período de estímulo lumínico, se le adicionó a la copa del ojo una solución iónica de pH 7,33 con una composición y concentración de electrolitos similar a la del líquido cefalorraquídeo denominada AMES. Este medio está compuesto por NaCl 119,5 mM, KCl 3,6 mM, NaH₂PO₄ 0,1

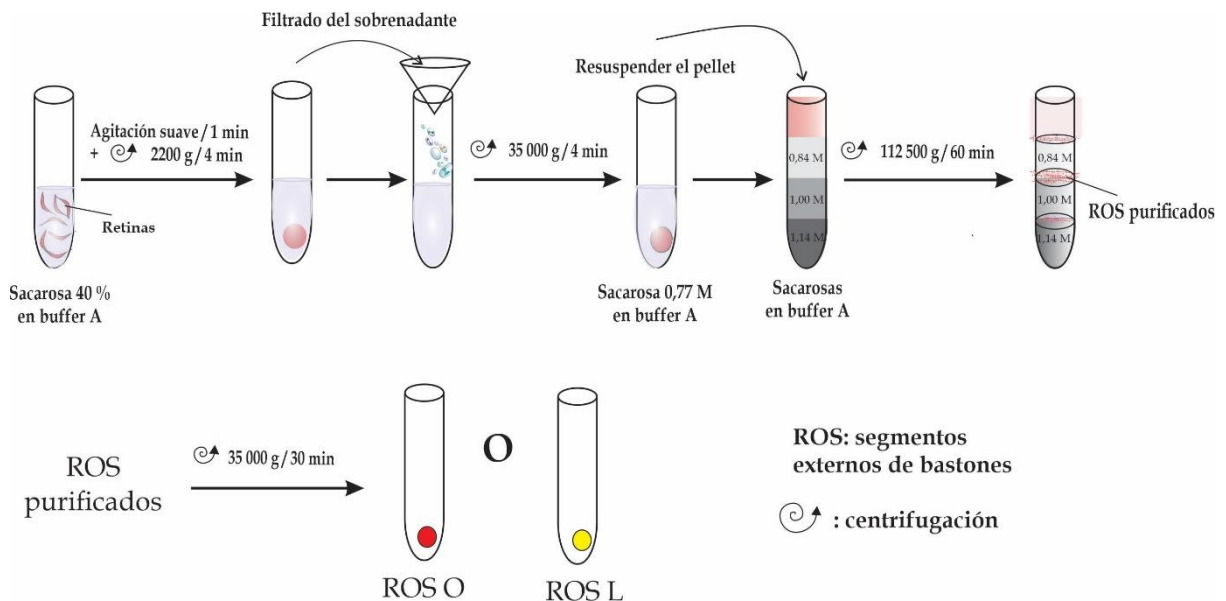
mM, Na_2HPO_4 0,4 mM, MgSO_4 1,2 mM, CaCl_2 1,15 mM, NaHCO_3 22,6 mM y 2 mg/ml de glucosa. El pH (7,33) del AMES fue logrado gaseando el medio con una mezcla de O_2 : CO_2 (95 : 5, v/v) (Ames y Hastings, 1956). Posteriormente, las retinas fueron separadas del epitelio pigmentario con una espátula de bordes romos, despegándolas suavemente desde el borde externo de la copa hacia la zona del nervio óptico, seccionándolo y permitiendo así la extracción de la retina. A partir de las retinas mantenidas en oscuridad o en luz se obtuvieron los segmentos externos de los bastones (ROS, por su sigla en inglés) que fueron denominados “ROS O” o “ROS L”, respectivamente.



Esquema 8. A) Sección del ojo bovino para la obtención de la copa ocular. B) Exposición de la copa del ojo a la luz.

Para la obtención de los ROS, las retinas fueron removidas de la copa del ojo y resuspendidas en una solución de sacarosa 40 % en *buffer* fosfato 70 mM (pH 7,2) conteniendo MgCl_2 1 mM, DTT 1 mM, PMSF 0,1 mM, aprotinina 1 mg/ml, pepstatina 1 mg/ml y leupeptina 2 mg/ml (*buffer* A). Estas fueron sometidas a agitación mecánica suave durante 1 minuto para desprender los ROS, y luego centrifugadas a $2200 \times g$ por 4 minutos. El sobrenadante fue diluido en una proporción 1 : 2 con *buffer* A libre de sacarosa y centrifugado a $35\,000 \times g$ por 30

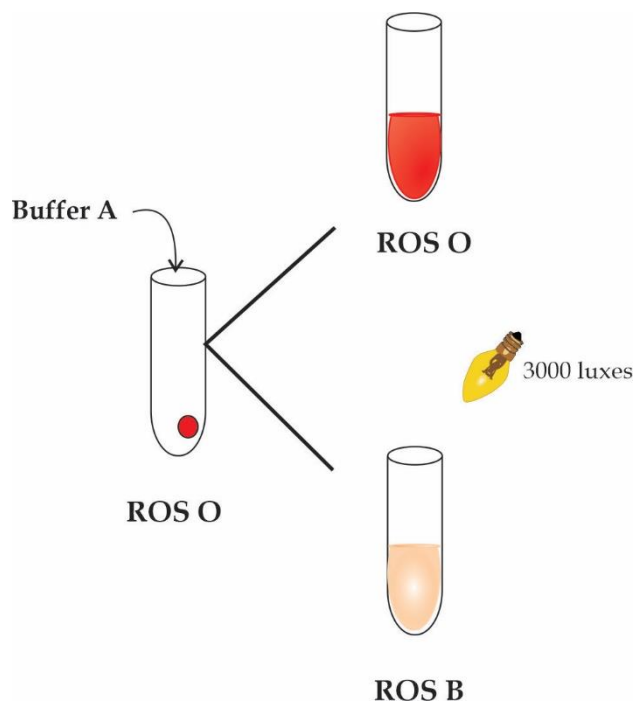
minutos. Los ROS sedimentados fueron resuspendidos en una solución de sacarosa 0,77 M en *buffer* A y sembrados sobre un gradiente discontinuo compuesto de sacarosa en concentraciones de 0,84 M, 1,00 M y 1,14 M, preparadas en *buffer* A. El gradiente fue centrifugado a 112 500 x g por 60 minutos, obteniéndose los ROS purificados en la interfase comprendida entre las densidades de sacarosa de 0,84 y 1,00 M. Estos fueron diluidos en *buffer* A libre de sacarosa en una proporción 1 : 2 y centrifugados a 35 000 x g por 30 minutos (Kuhn, 1982) (Esquema 9). Los ROS obtenidos fueron alicuotados y almacenados a -70 °C en oscuridad. Todo el procedimiento de extracción de los ROS fue realizado a 4 °C y bajo luz roja.



Esquema 9. Protocolo de obtención de ROS según el método de Kühn (1982). A partir de las retinas mantenidas en oscuridad o expuestas a luz (3000 luxes) por 30 minutos se obtuvieron los ROS O y los ROS L, respectivamente.

1.2 Exposición de los segmentos externos de las células fotorreceptoras a la luz. Obtención de segmentos externos de bastones provenientes de retinas mantenidas en oscuridad y expuestos a luz (ROS B)

Los ROS provenientes de ojos mantenidos en oscuridad (ROS O) fueron resuspendidos en *buffer* A libre de sacarosa y expuestos a 3000 luxes por 30 minutos a temperatura ambiente. Estos fueron denominados ROS B (Esquema 10).



Esquema 10. Los ROS aislados en oscuridad fueron expuestos a la luz (3000 luxes) por 30 minutos, obteniéndose los ROS B.

1.3 Análisis electroforético de las proteínas de ROS O, ROS L y ROS B

Para analizar la composición de las proteínas del ROS O, ROS L y ROS B, se utilizaron 10 o 35 μg de proteína resuspendidas en *buffer* Laemmli 5X (Tris 0,25 M pH 6,8, 2-mercaptoetanol 20 %, glicerol 40 %, SDS 8 % y azul de bromofenol 0,01 %) en una proporción 4 : 1 (muestra: Laemmli) (Laemmli, 1970). Estas muestras fueron

resueltas en SDS-PAGE empleando geles de acrilamida y bis acrilamida en *buffer* Tris-glicina al 10 % a una corriente constante de 0,03 amperios (Laemmli, 1970). Para teñir las proteínas, los geles fueron incubados con *Commassie Blue* (*Brilliam Blue R* 0,35 %, metanol 50 % y ácido acético 5 %) durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave, y luego lavados con una solución de metanol, agua y ácido acético (50 : 40 : 10, v/v) para retirar el exceso de colorante. El peso molecular de las proteínas analizadas se identificó empleando el marcador *Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope* (BIO-RAD, Hercules, CA, USA).

2. Inmunodetección de proteínas por *Western Blot*

2.1 Preparación de las muestras

La inmunodetección de los receptores y las enzimas se realizó empleando 100 µg de proteínas de ROS O, ROS L o ROS B. Las muestras fueron resuspendidas en *buffer* Laemmli 5X como se describe en la sección 1.3 de Materiales y Métodos, y calentadas a 60 °C durante 15 minutos. Además, se procesaron muestras de la fracción de membrana (80 µg) y del citosol (15 µg) de ROS O y ROS B. Para obtener estas fracciones, ambas preparaciones de ROS fueron resuspendidas en *buffer A* y centrifugadas a 35 000 x g durante 30 minutos a 4 °C. El pellet y el sobrenadante obtenidos correspondieron a la fracción de membrana y de citosol, respectivamente.

2.2 Electroforesis y transferencia de las proteínas

Las proteínas fueron resueltas en SDS-PAGE usando geles de acrilamida y bis acrilamida en *buffer* Tris-glicina al 10 % a una corriente constante de 0,03

amperios (Laemmli, 1970). Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a una membrana PVDF (Inmobilon-P PVDF) durante 75 minutos a 90 Voltios constantes, utilizando un *Mini Trans-Blot cell electro blotter* (BIO-RAD, Hercules, CA, USA).

2.3 Bloqueo, incubaciones con anticuerpos e inmunodetección

Las membranas obtenidas fueron bloqueadas con 5 % de leche descremada en *buffer* Tris salino (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM) pH 7,5 conteniendo 0,05 % de Tween 20 (TBS-T) por 1 hora, e incubadas toda la noche a 4 °C con distintos anticuerpos primarios. Estas fueron lavadas 3 veces con TBS-T durante 5 minutos cada vez, y seguidamente, incubadas por 3 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente (1 / 1000 - 1 / 4000) conjugado a la peroxidasa de rábano (HRP). Finalmente, las membranas fueron lavadas con TBS-T como se describió anteriormente. Las especificaciones de los diferentes anticuerpos primarios y secundarios empleados en esta Tesis se presentan en la Tabla 1.

Las bandas inmunoreactivas fueron detectadas por quimioluminiscencia usando placas de revelado fotográfico *Ultracruz Autoradiography Film* (Santa cruz, CA, USA).

Para la determinación del peso molecular de las proteínas de interés se empleó el marcador de peso molecular *Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope* (BIO-RAD, Hercules, CA, USA).

Los niveles de las proteínas de los receptores y de las enzimas del sistema cannabinoide fueron cuantificados empleando el programa *Image J* (*Image processing and Analysis in Java*).

Anticuerpos	Dilución	Procedencia	Anticuerpo secundario empleado
Primarios			
DAGL α	1 : 200	sc-390409; Santa Cruz, CA, USA	Mouse - IgGk BP - HRP
MAGL	1 : 500	sc-398942; Santa Cruz, CA, USA	Mouse - IgGk BP -HRP
CB1	1 : 500	sc-293419; Santa Cruz, CA, USA	Mouse - IgGk BP -HRP
CB1	1 : 3000	L15; donado por Dr. Ken Mackie.	Mouse - HRP
CB2	1 : 500	sc-293188; Santa Cruz, CA, USA	Mouse - IgGk BP -HRP
TRPV1	1 : 500	sc-12498; Santa Cruz, CA, USA	Goat - HRP
GPR55	1 : 500	ab203663; Abcam, Cambridge, UK	Rabbit - HRP
α -Tubulina	1 : 3000	CP06; EMD/Biosciences-Calbiochem, San Diego, CA, USA	Mouse - HRP
GAPDH	1 : 1000	#2118; EMD/Biosciences-Calbiochem, San Diego, CA, USA	Rabbit - HRP
Actina	1 : 1000	Sc-1615; Santa Cruz, CA, USA	Goat - HRP
Secundarios			
Rabbit - HRP	1 : 1000 - 1 : 4000	NA934, Amersham, GE Healthcare Life Sciences , Pittsburgh, PA, USA	
Goat - HRP	1 : 1000	sc-2020, Santa Cruz, CA, USA	
Mouse - HRP	1 : 1000 - 1 : 3000	sc-2005 Santa Cruz, CA, USA	
Mouse - IgGk BP - HRP	1 : 1000	sc-5116102; Santa Cruz, CA, USA	

Tabla 1. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en esta Tesis

3. Preparación de sustratos radiomarcados empleados en la determinación de las actividades enzimáticas

3.1 Obtención de [2-³H] fosfatidilcolina y [2-³H] triacilglicerol a partir de la incubación de retinas bovinas con [2-³H] glicerol

Los lípidos radiomarcados [2-³H] fosfatidilcolina ([³H] PC) y [2-³H] triacilglicerol ([³H] TAG) fueron obtenidos como describieron Pasquare y Giusto (Pasquare de García y Giusto, 1986).

3.1.1 Incubación de las retinas bovinas con [2-³H] glicerol

En este procedimiento se emplearon retinas bovinas obtenidas como se describe en la sección 1.1 de Materiales y Métodos. Las retinas aisladas de los ojos bovinos fueron incubadas con [2-³H] glicerol (actividad específica 2 Ci/mmol) (PerkinElmer, Boston, MA, Estados Unidos) a 37 °C con agitación suave y continua durante 2 horas en un Erlenmeyer de 250 ml a razón de 5 retinas por recipiente. Se utilizaron 10 µCi de [2-³H] glicerol y 7 ml del medio de incubación AMES por retina (Ames y Hastings, 1956). Cada Erlenmeyer estaba provisto de un tapón de goma con agujas para la entrada y salida de gas carbógeno (oxígeno-anhídrido carbónico (95 : 5, v/v)), siendo la aguja de entrada de mayor calibre que la de salida para poder mantener sobre la superficie del líquido una presión conveniente. El gas primeramente se hizo burbujear en una trampa de agua destilada para mantener su humedad.

3.1.2 Extracción, separación e identificación de los lípidos radiomarcados de las retinas bovinas

Luego de transcurrido el tiempo de incubación, las retinas fueron separadas del medio y los lípidos fueron extraídos del tejido con una mezcla de cloroformo (C) : metanol (M) (2 : 1, v/v) según el procedimiento descrito por Folch (Folch y col., 1957). Las retinas fueron homogeneizadas empleando un homogeneizador de tejido tipo Potter-Elvehjem con vástago de teflón (*Clearance*: 0,15 - 0,23 mm). El homogenado resultante se filtró y se trasvasó a un erlenmeyer con tapón de vidrio esmerilado. El extracto se dejó reposar a temperatura ambiente durante 4 horas y seguidamente se guardó bajo atmósfera de nitrógeno (N₂), a 4 °C durante 24 horas, para luego proceder a la purificación de los lípidos. Para este fin, se trasvasó a tubos de tapa esmerilada y se particionó con una solución acuosa de CaCl₂ 0,05 % conteniendo glicerol 0,1 % en una proporción de 0,2 veces el volumen del solvente orgánico final. Las fases acuosa metanólica (fase superior) y clorofórmica (fase inferior) fueron separadas por centrifugación a 900 x g durante 5 minutos, marcándose el menisco superior sobre cada tubo, previo a descartar la fase superior. Sobre la fase inferior se agregó hasta la marca la fase superior teórica (FST), la cual consiste en una mezcla de: C : M : CaCl₂ 0,05 % (3 : 48 : 47, v/v/v) conteniendo glicerol 0,1 %. Los tubos se centrifugaron a 900 x g durante 5 minutos para separar las fases. El lavado con FST se realizó 2 veces. Los lípidos de la fase inferior fueron concentrados bajo atmósfera de N₂ y resuspendidos en un volumen

pequeño de C : M (2 : 1, v/v). El extracto lipídico purificado se mantuvo bajo atmósfera de N₂ a -20 °C hasta la posterior separación en sus distintas especies lipídicas.

Para la separación de [³H] PC y [³H] TAG del resto de los lípidos radiomarcados, se utilizó cromatografía en capa fina (TLC). Como soporte se emplearon placas de vidrio de 20 cm x 20 cm, la fase estacionaria de 600 μm de espesor, se preparó con una suspensión de *silica gel* G o H (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) dependiendo de los lípidos a separar. Antes de ser utilizadas, las placas fueron activadas a 110 °C en estufa durante un período que varió de 30 minutos a 1 hora. La fase móvil, compuesta por la mezcla de solventes adecuada a los lípidos a separar, se preparó y vertió sobre una cuba de vidrio donde se desarrollaron las cromatografías.

Para separar la [³H] PC y los lípidos neutros del resto de los lípidos, se realizó una TLC monodimensional utilizando como fase estacionaria *silica gel* H preparada en una solución de acetato de Mg²⁺ al 3 % y como fase móvil C : M : H₂O (65 : 25 : 4, v/v/v). La mancha correspondiente a la [³H] PC y la correspondiente a los lípidos neutros fueron raspadas en tubos de tapa esmerilada y luego eluidas de la *silica* mediante la técnica de Arvidson (Arvidson, 1968).

La [³H] PC purificada fue llevada a sequedad bajo atmósfera de N₂, resuspendida en un volumen conocido de C : M (2 : 1, v/v), y almacenada bajo atmósfera de N₂ a -20 °C. De esta solución se tomó una alícuota para determinar la radioactividad por espectrometría de centelleo líquido y otra para determinar el contenido de fósforo. Con estos datos se calculó la actividad específica de la [³H] PC

obtenida que fue de $50 \times 10^{-3} \mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$. Posteriormente, esta [^3H] PC fue empleada para obtener el [^3H] DAG (Sección 3.2 de Materiales y Métodos).

Por otra parte, los lípidos neutros extraídos de la *silica* fueron llevados a sequedad bajo atmósfera de N_2 y resuspendidos en un volumen pequeño de cloroformo. Con el fin de separar los lípidos neutros entre sí, se realizó una TLC monodimensional empleando como fase estacionaria *silica gel* G preparada en agua destilada y como fase móvil un sistema de solventes formado por hexano (H): éter etílico (E): ácido acético (Ac.Ac) (45 : 55 : 1,5, v/v/v). La mancha correspondiente al [^3H] TAG fue raspada en tubos de tapa esmerilada. Seguidamente, este lípido fue extraído de la *silica* utilizando una mezcla de H: 2-propanol (P) (3 : 2, v/v). El [^3H] TAG purificado fue llevado a sequedad bajo atmósfera de N_2 y resuspendido en un volumen conocido de cloroformo para luego ser almacenado a -20°C , previo a ser gaseado con N_2 .

El [^3H] TAG generado fue empleado para obtener el [^3H] monoacilglicerol ([^3H] MAG) por la acción enzimática de una lipasa (Sección 3.3 de Materiales y Métodos). Los lípidos separados en las distintas TLC, se identificaron sembrando en las placas estándares de referencia adecuados. Como el propósito en este caso fue aislar los lípidos para utilizarlos como sustratos enzimáticos, resultó importante la elección de un método de revelado que no dañara sus estructuras. En consecuencia, la visualización se realizó bajo luz ultravioleta luego de rociar la placa con 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) al 0,05 % en

metanol. Estos procedimientos se realizaron bajo una atmósfera de N₂ para minimizar la peroxidación de los ácidos grasos insaturados.

3.2 Obtención de [2-³H] diacilglicerol a partir de la hidrólisis de la [2-³H] fosfatidilcolina de la retina bovina

Para la obtención del [³H] DAG se utilizó la [³H] PC que provenía de retinas bovinas incubadas con [2-³H] glicerol como se especifica en la sección 3.1 de Materiales y Métodos. Para este fin, se incubó la [³H] PC (1,20 mM) solubilizada en etanol 2 % en éter etílico (v/v) en presencia de la fosfolipasa C de *Clostridium welchii* (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados unidos) en *buffer* Tris- HCl 50 mM pH 7,3 conteniendo CaCl₂ 3 mM. La incubación fue realizada a temperatura ambiente y agitación constante durante 4 horas. La [³H] PC y el [³H] DAG fueron extraídos con éter etílico conteniendo 1 % de agua y separados por TLC monodimensional empleando como fase estacionaria *silica gel* G preparada en agua destilada y como fase móvil un sistema de solventes formado por H : E : AcAc (45 : 55 : 1,5, v/v/v). El [³H] DAG fue extraído de la *silica* con H : P (3 : 2, v/v), y almacenado en cloroformo bajo atmósfera de N₂ a -20°C (Gaveglio y col., 2011). Se utilizó este solvente de almacenamiento en lugar de C : M (2 : 1) para evitar la isomerización del DAG. Asimismo, se tomaron alícuotas del mismo para determinar la radioactividad y la masa por espectrometría de centelleo líquido y por cromatografía gas-líquido (GLC), respectivamente. Su actividad específica fue de 50 x 10⁻³ μCi/μmol.

3.3 Obtención de [2-³H] monoacilglicerol a partir de la hidrólisis del [2-³H] triacilglicerol de la retina bovina

El [³H] TAG generado por incubaciones de retinas bovinas con [2-³H] glicerol, como se especifica en la sección 3.1 de Materiales y Métodos, fue empleado como fuente para obtener [³H] monoacilglicerol ([³H] MAG). La hidrólisis del [³H] TAG se realizó por medio de una lipasa pancreática de cerdo (Calbiochem, Los Angeles, CA, Estados Unidos). Esta enzima cataliza la reacción de manera secuencial, es decir, primero produce DAG y luego, a partir de éste, genera monoacilglicerol (MAG) (Lykidis y col., 1994). Para la reacción se utilizó [³H] TAG 30 μ M en *buffer* fosfato 20 mM pH 7,0 conteniendo NaCl 3 M, CaCl₂ 75 mM y deoxicolato de sodio 50 mM. La incubación fue realizada a temperatura ambiente y agitación constante durante 12 minutos. La reacción se frenó con el agregado de C : M (2 : 1, v/v) y los lípidos fueron extraídos según la técnica de Folch (Folch y col., 1957). Seguidamente, los lípidos neutros fueron separados por TLC como se describe en la sección 3.1.2 de Materiales y Métodos. El producto de la reacción, [³H] MAG, fue extraído de la *silica* según la técnica de Arvidson y almacenado en C : M (2 : 1, v/v) bajo atmósfera de N₂ a -20°C (Gaveglio y col., 2011, Arvidson, 1968). Asimismo, se tomaron alícuotas para determinar la radioactividad y la masa por espectrometría de centelleo líquido y GLC, respectivamente. Su actividad específica fue de $150 \times 10^{-2} \mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$.

4. Análisis de la composición de los ácidos grasos del [2-³H] diacilglicerol y [2-³H] monoacilglicerol

La composición de [³H] DAG y [³H] MAG utilizados como sustratos para los ensayos enzimáticos fue determinada por GLC. Las manchas correspondientes a estos lípidos luego de ser separados por TLC y visualizados por un método no destructivo, fueron raspadas, y la *silica* fue transferida a tubos con tapa a rosca con cubierta interna de Teflón para obtener los metil ésteres de ácidos grasos (FAME). Después de la metanólisis, las muestras fueron sometidas a GLC.

4.1 Obtención de los metil ésteres de ácidos grasos

Los FAME se obtuvieron por metanólisis catalizada por trifluoruro de boro al 14 % en metanol a 45 °C bajo N₂ durante toda la noche siguiendo la técnica de Morrison y Smith (Morrison y Smith, 1964). Junto con las muestras se procesaron los controles correspondientes que permitieron evaluar la recuperación y la cuantificación de los ácidos grasos derivatizados. Una vez obtenidos los FAME en una solución metanólica, se procedió a extraerlos mediante partición con hexano y agua en igual proporción que la solución de metanol. Luego se purificaron por TLC utilizando placas de *silica gel G* previamente lavadas con M : E (75 : 25, v/v) y una fase móvil compuesta por la mezcla de solventes H : E (95 : 5, v/v). Los FAME se visualizaron bajo luz ultravioleta luego del rociado de las placas con DCF. Para extraerlos de la *silica*, se realizó una partición

entre H₂O : M : H (1 : 1 : 1, v/v/v), y posteriormente tres extracciones secuenciales con hexano, mediante agitación y centrifugación.

4.2 Análisis de los metil ésteres de ácidos grasos por cromatografía en fase gaseosa

Los FAME se separaron por cromatografía de reparto gas-líquido en función de la longitud de su cadena y de su grado de insaturación. Para ello, se utilizó un cromatógrafo Varian 3700 que cuenta con dos columnas de vidrio (2 m x 2 mm de diámetro) empaquetadas con una fase estacionaria polar SP2330 (Supelco, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) 10 %, empleando N₂ como gas portador (30 ml/minuto). Este cromatógrafo está acoplado a dos detectores de ionización de llama utilizando un electrómetro diferencial de dos canales. Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 220 °C y 230 °C, respectivamente. Las separaciones se realizaron sometiendo el horno de las columnas a gradientes de temperatura, en la mayor parte de los casos con incrementos lineales de 5 °C por minuto desde una temperatura inicial de 155 °C a una temperatura final de 230 °C, la cual se mantuvo constante durante el tiempo necesario para permitir la elución completa (aproximadamente 20 minutos).

Los FAME fueron identificados en base a sus tiempos de retención utilizando estándares comerciales. La cuantificación se realizó, según se señaló anteriormente, con un detector por ionización de llama, empleando integración electrónica (Varian Workstation).

Los reactivos utilizados para determinar la composición de los ácidos grasos presentes en los distintos lípidos fueron adquiridos en Sigma Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos) y en J.T.Baker (Millinckrodt Baker, Phillipsburg, NJ, Estados Unidos).

5. Determinación de las actividades enzimáticas del metabolismo del 2-araquidonoilglicerol

Las enzimas de síntesis (DAGL y LPAP) y de hidrólisis (MAGL) del 2-AG fueron ensayadas a 37°C. Estas reacciones se realizaron bajo luz roja con el fin de analizar únicamente el efecto de la luz sobre la retina o sobre el ROS aislado. Los blancos para cada ensayo enzimático se hicieron de igual manera que los ensayos experimentales, excepto que la proteína del ROS fueron previamente desnaturalizada adicionando C : M (2 : 1, v/v).

5.1 Ensayo enzimático de la actividad de la diacilglicerol lipasa

La actividad de la DAGL fue ensayada empleando como sustrato [³H] DAG en *buffer* MOPS 50 mM, pH 7,4 conteniendo albúmina sérica bovina (BSA) libre de ácidos grasos al 0,25 % en un volumen final de 100 µl (Rosenberger y col., 2007). Se utilizó 150 µg de proteína de ROS y se adicionó [³H] DAG 2 mM (20 000 dpm) con una concentración equimolar de oleoil-lisofosfatidilcolina (LPC) (Sigma Aldrich St. Louis, MO, Estados Unidos). Después de 60 minutos de incubación la actividad enzimática fue frenada con el agregado de C : M (2 : 1, v/v). La fase orgánica fue separada de la acuosa luego de agregar CaCl₂ 0,05 %, y centrifugar a 900 x g durante 5 minutos. A

partir de la fase orgánica (inferior) los lípidos [^3H] MAG y [^3H] DAG fueron resueltos como se especifica en la sección 5.4 de Materiales y Métodos (Giusto y Bazan, 1979).

5.2 Ensayo enzimático de la actividad de la lisofosfatidato fosfohidrolasa

Para ensayar la actividad de la lisofosfatidato fosfohidrolasa (LPAP) se empleó como sustrato 1-[9,10- ^3H]oleoil-lisofosfatidato (1-[9,10- ^3H]oleoil-LPA) (Actividad específica de 54 mCi / μmol) (American Radiolabeled Chemicals, Inc, St. Louis, MO, Estados Unidos) 6000 dpm y 1-oleoil LPA frío 20 μM (Sigma Aldrich St. Louis, MO, Estados Unidos) en BSA al 0,1 %. La incubación se hizo en *buffer* Tris-HCl 100 mM pH 7,4 conteniendo DTT 1,2 mM y EDTA 2 mM, en un volumen final de 100 μl (Baker y Chang, 2000). Previo al agregado del sustrato, los ROS (100 μg de proteína) se preincubaron con una solución de NEM 4,4 mM en el mismo *buffer* de ensayo por 10 minutos. Luego, se adicionó el sustrato y tras 15 minutos de incubación la reacción enzimática fue finalizada con el agregado de C : M (1 : 1, v/v). El sustrato y los productos de la reacción [^3H] oleoil-MAG y [^3H] oleato fueron separados como se indica en la sección 5.4 de Materiales y Métodos.

5.3 Ensayo enzimático de la actividad de la monoacilglicerol lipasa

La actividad de la MAGL fue determinada incubando ROS (100 μg de proteína) en presencia de [^3H] MAG 10 μM (2500 dpm) en *buffer* Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) conteniendo EDTA 1 mM en un volumen final de 100 μl durante 15 minutos. El sustrato fue preparado en el *buffer* de ensayo conteniendo BSA libre de ácidos grasos 1,25

mg/ml (Blankman y col., 2007, Baker y Chang, 2000). La reacción fue detenida adicionando C : M (1 : 1, v/v) y mantenida a 4°C durante 30 minutos. El producto de la reacción [³H] glicerol fue extraído en la fase acuosa como se indica en la sección 5.4 de Materiales y Métodos y el sustrato sin reaccionar obtenido a partir de la fase orgánica.

En la determinación de la actividad de la MAGL, acoplada a la de la DAGL, el [³H] glicerol formado fue recuperado particionando el extracto con 0,2 volúmenes de CaCl₂ 0,05 % y centrifugando a 900 x g durante 5 minutos. Esto llevó a la formación de dos fases, una acuosa (superior) que fue separada en una vial para cuantificar [³H] glicerol, y la otra orgánica (inferior) que fue llevada a sequedad bajo N₂ y resuspendida en C : M (2 : 1, v/v), para separar [³H] MAG y [³H] DAG como se detalla en la sección 5.4 de Materiales y métodos.

En todos los casos los sustratos y los productos de las distintas reacciones enzimáticas fueron identificados empleando estándares de referencia, visualizados por revelado con iodo y determinada su radioactividad por espectroscopia de centelleo líquido.

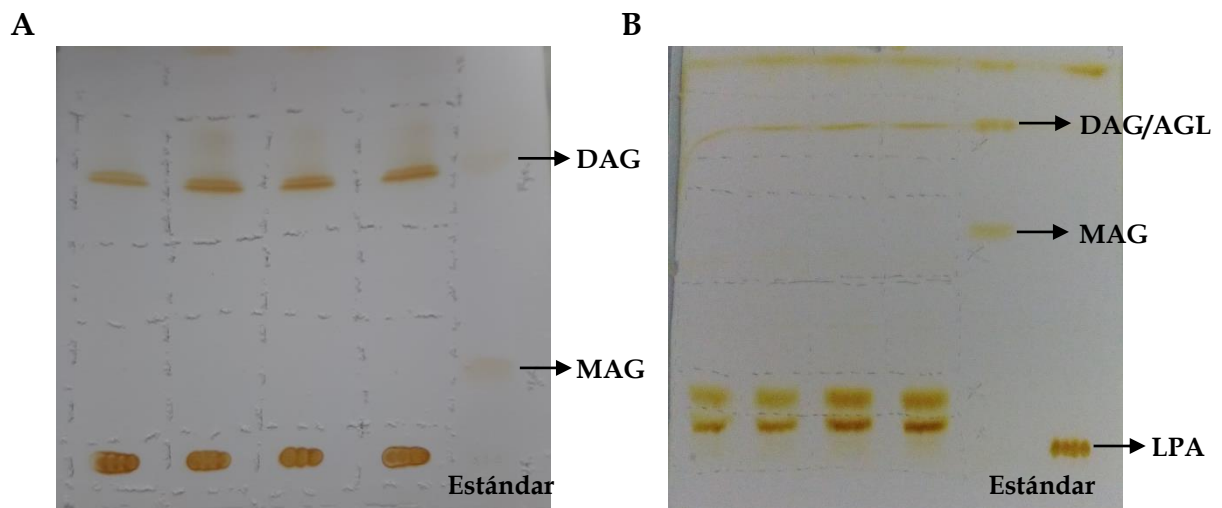
5.4 Extracción y separación de los sustratos y de los productos de las actividades enzimáticas

En la reacción enzimática de la DAGL, el [^3H] DAG y el [^3H] MAG fueron separados a partir de la fase orgánica empleando como fase estacionaria *silica gel G* preparada en agua y como fase móvil H : E : Ac.Ac (45 : 55 : 1,5, v/v) (Esquema 11 A).

En el ensayo de la actividad de la LPAP, después de frenar la reacción, se adicionó 1 ml de C : M : HCl 12,5 N (1 : 1 : 0,06, v/v/v) dejándose en reposo durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego, el extracto fue reconstituído con 2 ml de cloroformo de manera que la mezcla de C : M quedara en una proporción 2 : 1 (v/v), particionado con 0,2 volúmenes de agua destilada, y posteriormente, centrifugado a 900 x g durante 5 minutos, lo que llevó a la formación de dos fases. La fase acuosa (superior) fue separada en una vial, llevada a sequedad a temperatura ambiente y cuantificada su radioactividad. La fase orgánica (inferior) fue llevada a sequedad bajo N_2 y resuspendida en C : M (2 : 1, v/v) para la separación cromatográfica. Sus componentes lipídicos, [^3H] MAG, [^3H] oleato y el [^3H] LPA fueron separados utilizando *silica gel H* preparada en una solución de acetato de magnesio al 3 % como fase estacionaria y como fase móvil C : acetona (A) : M : Ac.Ac : H_2O (30 : 40 : 10 : 10 : 4, v/v) (Rouser II) (Rouser y col., 1970). La placa fue cromatografiada hasta un tercio y después re-cromatografiada con H : E : Ac.Ac (45 : 55 : 1,5, v/v) hasta su borde superior (Esquema 11 B).

Una vez frenada la reacción de la MAGL se adicionó 100 μ l de *buffer* de ensayo a cada tubo, los que fueron agitados y mantenidos en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, los mismos fueron centrifugados a 900 x g por 5 minutos, formándose dos fases. La fase acuosa (superior) conteniendo el producto [3 H] glicerol y la fase orgánica (inferior) el sustrato ([3 H] MAG). Estas fases fueron separadas en viales, secadas a temperatura ambiente y cuantificadas.

Los solventes empleados para la extracción, purificación y separación de las distintas especies lipídicas fueron adquiridos en los laboratorios J.T.Baker (Millinckrodt Baker, Phillipsburg, NJ, Estados Unidos) y U.V.E. (Dorwil S.A., Buenos Aires, Argentina). Los reactivos utilizados en la preparación de *buffers* para la incubación de las retinas bovinas fueron obtenidos en Sigma Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos).



Esquema 11. Cromatografías realizadas para separar los lípidos después de los ensayos enzimáticos. **A.** Para la actividad de la DAGL se utilizó como F.E: *silica gel G* preparada en agua y como F.M: H : E : AcAc (45 : 55 : 1,5, v/v/v). **B.** En la actividad de la LPAP se usó como F.E:

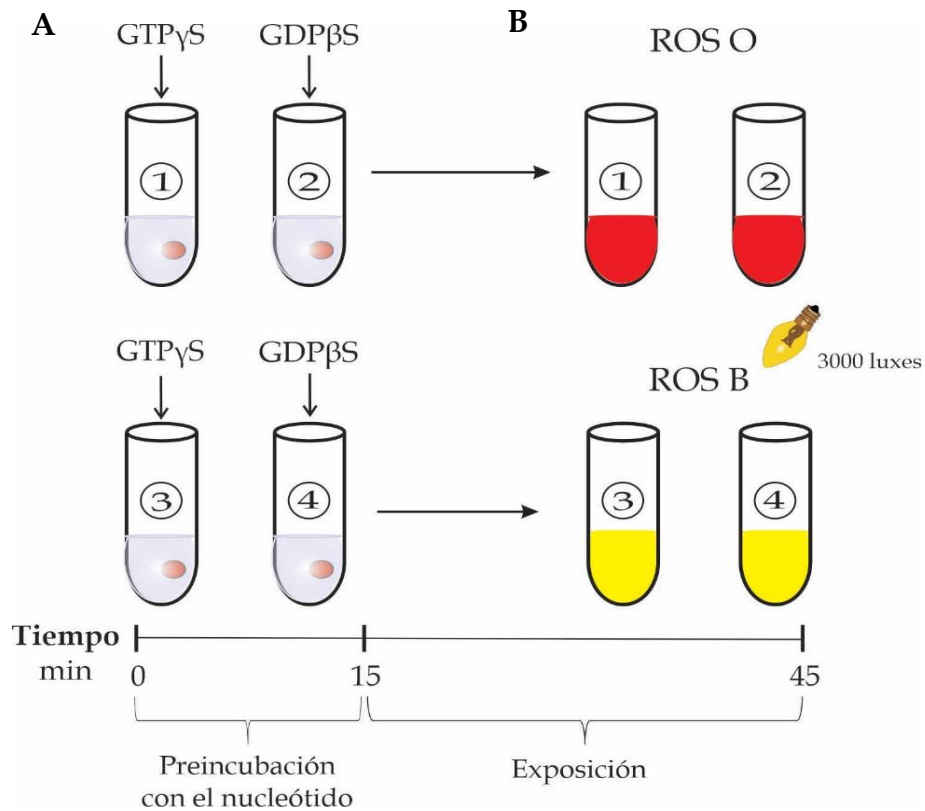
silica gel H preparada en acetato de magnesio al 3 % y como F.M: 1° Rouser II hasta un tercio de la placa y 2° H : E : AcAc (45 : 55 : 1,5, v/v/v) en el mismo sentido que la primera corrida pero hasta el borde superior de la placa. Los lípidos fueron revelados con vapores de yodo. Ácidos grasos libres (AGL), diacilglicerol (DAG), lisofosfatidato (LPA), monoacilglicerol (MAG), F.E: Fase estacionaria, F.M: Fase móvil.

6. Ensayo experimental para analizar el rol de las proteínas involucradas en el proceso de fototransducción en el metabolismo del 2-araquidonoilglicerol

6.1 Incubación de los ROS con análogos de nucleótidos de guanina: GTP γ S y GDP β S

En esta serie de experimentos se analizó si el GTP γ S (que disocia la subunidad G α de la G $\beta\gamma$) y/o el GDP β S (que mantiene a la proteína G en su estado heterotrimérico) en condiciones de oscuridad o luz modifican las actividades de las enzimas de síntesis (DAGL y LPAP) y de hidrólisis (MAGL) del 2-AG.

Para esto, previo al ensayo de las actividades enzimáticas, los ROS O (2,3 mg de proteínas) fueron resuspendidos en 320 μ l de *buffer* A (Sección 1.2 de Materiales y Métodos) libre de sacarosa conteniendo Guanosín 5' [γ -tio] trifosfato (GTP γ S) (Sigma Aldrich) o Guanosín 5' [β -tio] difosfato (GDP β S) (Sigma Aldrich) a una concentración final de nucleótido de 1 mM (Pasquare y col., 2000), y preincubados bajo luz roja durante 15 minutos (Esquema 12 A). Luego de este tratamiento, los ROS se mantuvieron en oscuridad (ROS O) o fueron expuestos a 3000 luxes por 30 minutos a temperatura ambiente (ROS B) (Esquema 12 B).



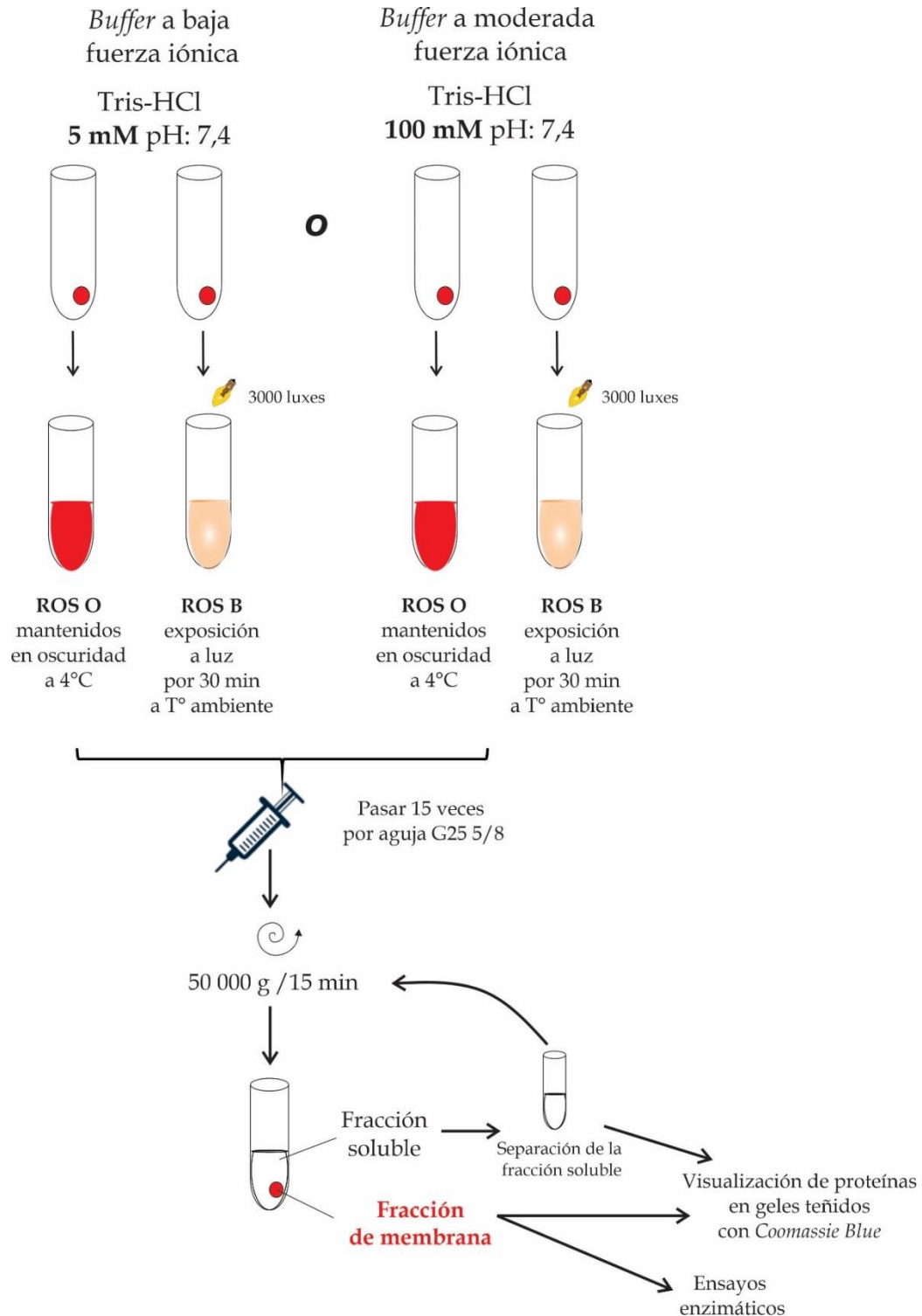
Esquema 12. Los ROS O (2,3 mg de proteína) fueron preincubados durante 15 minutos con 1 mM de $GTP\gamma S$ o de $GDP\beta S$ en luz roja (A) y luego mantenidos en oscuridad (ROS O) o expuestos a 3000 luxes por 30 minutos (ROS B) (B) a temperatura ambiente.

6.2 Extracción selectiva de proteínas que se asocian a la membrana del ROS empleando *buffers* de distinta fuerza iónica

Con el objetivo de analizar si la extracción selectiva de proteínas solubles y periféricas que están involucradas en el proceso de fototransducción modifica la actividad de la DAGL y de la MAGL, enzimas reguladas por luz, se utilizaron *buffers* de distinta fuerza iónica. El *buffer* Tris-HCl 5 mM (baja fuerza iónica) remueve proteínas

solubles y periféricas y el de 100 mM (moderada fuerza iónica) remueve proteínas solubles a pH 7,4.

Los ROS mantenidos en oscuridad (3,5 mg de proteína/ml) fueron resuspendidos en *buffer* Tris-HCl 5 mM o Tris-HCl 100 mM a pH 7,4. De cada tratamiento se separaron dos tubos, uno se mantuvo en oscuridad y otro fue sometido a 3000 luxes por 30 minutos. Transcurrido ese tiempo los ROS fueron pasados 15 veces a través de una aguja G25 5/8, y posteriormente centrifugados a 50 000 x g durante 15 minutos para obtener la fracción de membrana (Esquema 13). Ambos *buffers* contenían MgCl₂ 0,5 mM, DTT 1 mM, PMSF 0,1 mM, aprotinina 1 mg/ml y leupeptina 2 mg/ml. La actividad enzimática de la MAGL fue ensayada en estas fracciones como se detalla en la sección 5.3 de Materiales y Métodos.



Esquema 13. Tratamiento de los ROS con *buffers* de distinta fuerza iónica para la extracción selectiva de proteínas. Las fracciones de membrana y soluble obtenidas fueron empleadas para la identificación de proteínas, y a partir de la primera se ensayó la actividad de la enzima de

hidrólisis del 2-AG. La fracción soluble fue nuevamente centrifugada a 50 000 x g durante 15 minutos para remover los restos de membrana.

6.2.1 Análisis electroforético de las fracciones de membrana y soluble de los ROS tratados con los *buffers* de distinta fuerza iónica

Con el propósito de verificar que proteínas fueron extraídas por los diferentes tratamientos, los ROS O y ROS B enteros (35 µg de proteína), la fracción de membrana (35 µg de proteína) y el soluble respectivo (10 µg de proteína) obtenidos a partir de ROS O y ROS B tratados con los *buffers* de distinta fuerza iónica fueron sometidos a electroforesis. Las fracciones fueron resuspendidas en *buffer* Laemmli 5X y resueltas en SDS-PAGE empleando geles de acrilamida y bis acrilamida, y finalmente teñidas con *Commasie Blue*. Todo el procedimiento se realizó como se detalla en la sección 1.3 de Materiales y Métodos.

7. Ensayo experimental para analizar la acción de agonistas y antagonistas de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 sobre el metabolismo del 2-araquidonoilglicerol

Con el fin de establecer una posible acción de ligandos de receptores CB1 y CB2 sobre el metabolismo de 2-AG, se realizaron los ensayos enzimáticos de LPAP y MAGL en presencia de agonistas y/o antagonistas de los receptores cannabinoides.

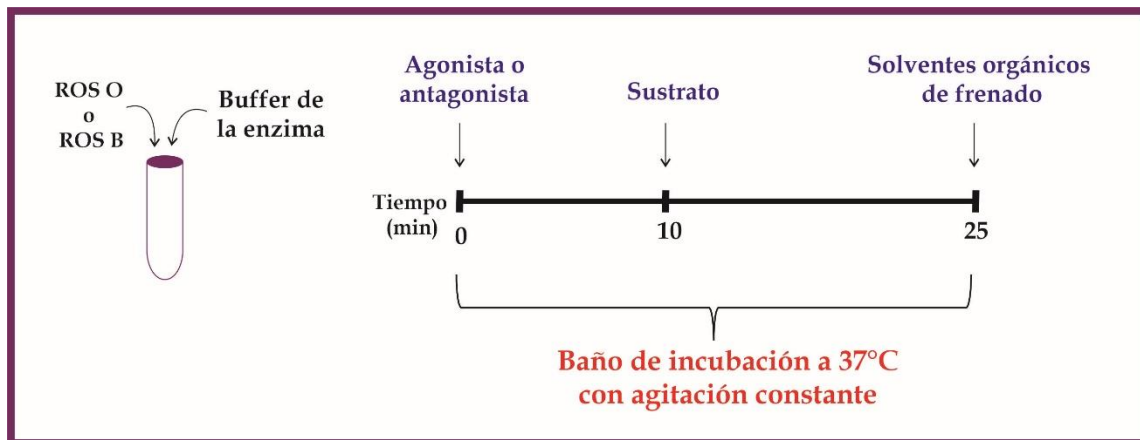
7.1 Incubación de los ROS con agonistas y antagonistas de receptores CB1 y CB2

La acción de agonistas o de antagonistas de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 sobre las distintas actividades enzimáticas involucradas en la síntesis y degradación de los endocannabinoides se determinó preincubando los ROS O ó ROS B en el *buffer* de ensayo de cada una de las enzimas durante 10 minutos en presencia de:

- 5 μM de WIN55212-2 (WIN), agonista de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 (Felder y col., 1995, D'Ambra y col., 1992).
- 5 μM de JWH-133 (JWH), agonista del receptor cannabinoide CB2 (Huffman y col., 1999).
- 1 μM de SR141716 (SR1), antagonista del receptor cannabinoide CB1 (Rinaldi-Carmona y col., 1995).
- 1 μM de SR144528 (SR2), antagonista del receptor cannabinoide CB2 (Rinaldi-Carmona y col., 1998).
- 1 μM de SR1 y 1 μM de SR2 en simultáneo.

Los agonistas y antagonistas de los receptores CB fueron vehiculizados en DMSO alcanzando éste una concentración final en el ensayo enzimático de 0,2 %.

El Esquema 14 ejemplifica en una línea de tiempo el ensayo de una actividad enzimática, donde se visualiza el momento del agregado del ligando, la preincubación con el mismo, y el inicio y frenado de la reacción.



Esquema 14. Evaluación del efecto de agonistas y/o antagonistas sobre la actividad de las enzimas de síntesis e hidrólisis del 2-AG. El esquema representa un ejemplo de ensayo enzimático en una línea de tiempo. El agonista o antagonista fue adicionado al tubo que contenía ROS O ó ROS B y el *buffer* de la enzima. A los 10 minutos de incubación se da inicio al ensayo enzimático con el agregado del sustrato radiomarcado respectivo. El tiempo del ensayo varió dependiendo de la enzima a evaluar. La reacción fue detenida adicionando solvente orgánico.

8. Métodos Analíticos

8.1 Determinación de proteínas

Las proteínas fueron cuantificadas por el método colorimétrico descrito por Lowry (Lowry y col., 1951). Estas fueron solubilizadas en SDS al 10 % y diluídas hasta una concentración final de SDS del 5 % (máxima concentración compatible con el método). La curva estándar fue realizada empleando una solución de BSA (1 mg/ml) en SDS al 5 % (p / v). La cuantificación proteica se realizó empleando el kit comercial *DC Protein Assay* (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) y siguiendo lo especificado en el mismo.

Este método de determinación de proteínas consta de dos etapas. En la primera etapa los iones de Cu^{2+} en medio alcalino forman un complejo con el nitrógeno de los enlaces peptídicos. Este complejo provoca el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína exponiendo los residuos fenólicos de los aminoácidos tirosina y triptófano. En la segunda parte de la reacción, el reactivo de Folin- Ciocalteu (ácido fosfomolibdotúngstico) es reducido por los grupos fenólicos dando un color azul intenso, que es cuantificado a 750 nm.

8.2 Determinación de la radioactividad por espectrometría de centelleo líquido

La radioactividad de los sustratos empleados para determinar las diferentes actividades enzimáticas como los productos de las mismas fueron cuantificados después de adicionarles 0,25 ml de agua y 5 ml de una mezcla de Preblended Dry Fluor 0,5 % (PPO 98 % y bis- MSD 2 %) en tolueno/ Arkopal N-100 (4 : 1, v/v).

9. Análisis estadístico

Las actividades de las enzimas del metabolismo del 2-AG fueron medidas utilizando un mínimo de tres *pools* diferentes con tres réplicas por condición. En los ensayos con los *buffers* de diferente fuerza iónica se realizaron tres tratamientos independientes (ensayo) con tres réplicas de un mismo *pool*, y en los estudios del efecto de agonistas / antagonistas de receptores cannabinoides se hicieron cinco mediciones de un *pool*. Para determinar diferencias significativas se comprobaron los supuestos del diseño completamente aleatorizados y se definió el tipo de estadística a utilizar

(paramétrica o no paramétrica). Para los datos paramétricos se utilizó la prueba de *T-student* (dos comparaciones), análisis de varianza (ANOVA) simple (más de dos comparaciones) o una ANOVA doble (para evaluar los efectos de dos factores). Las comparaciones múltiples fueron realizadas empleando el post test de *Fisher LSD*. Para analizar los datos no paramétricos, se utilizó el test de *Kruskal Wallis*. Para el análisis estadístico se empleó el programa Infostat versión 2018 (Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>). Los datos graficados corresponden a la media \pm error estándar de la media de un n mínimo igual a tres. Los grados de significatividad (p) se expresan en las leyendas de las figuras. Las diferencias entre más de dos comparaciones están representadas en letras. Las letras diferentes representan diferencias significativas. Los valores de $p < 0,05$ se consideran estadísticamente significativos.

CAPÍTULO I

**ESTUDIO DEL METABOLISMO DEL 2-
ARAQUIDONOILGLICEROL Y SU MODULACIÓN POR
ESTÍMULO LUMÍNICO EN LOS SEGMENTOS EXTERNOS
DE LOS BASTONES**

RESULTADOS

1. Efecto de la luz en los niveles de las proteínas enzimáticas involucradas en el metabolismo del 2-araquidonoilglicerol

Las enzimas de síntesis (PLC β 1 y DAGL α) y de hidrólisis (MAGL), implicadas en el metabolismo del 2-araquidonoilglicerol fueron analizadas por la técnica de *Western Blot* (WB) empleando los anticuerpos específicos para cada una de ellas.

Respecto a las enzimas de síntesis, el nivel de la enzima PLC β 1 incrementó un 99 % (Fig. 1 A), mientras que el nivel de la enzima DAGL α disminuyó un 15 % (Fig. 1 B), en ROS L respecto a ROS O. La DAGL α detectada en los ROS presentó un peso molecular de ~70 kDa, a diferencia del peso molecular de esta enzima descrita en tejido nervioso humano que es de ~120 kDa.

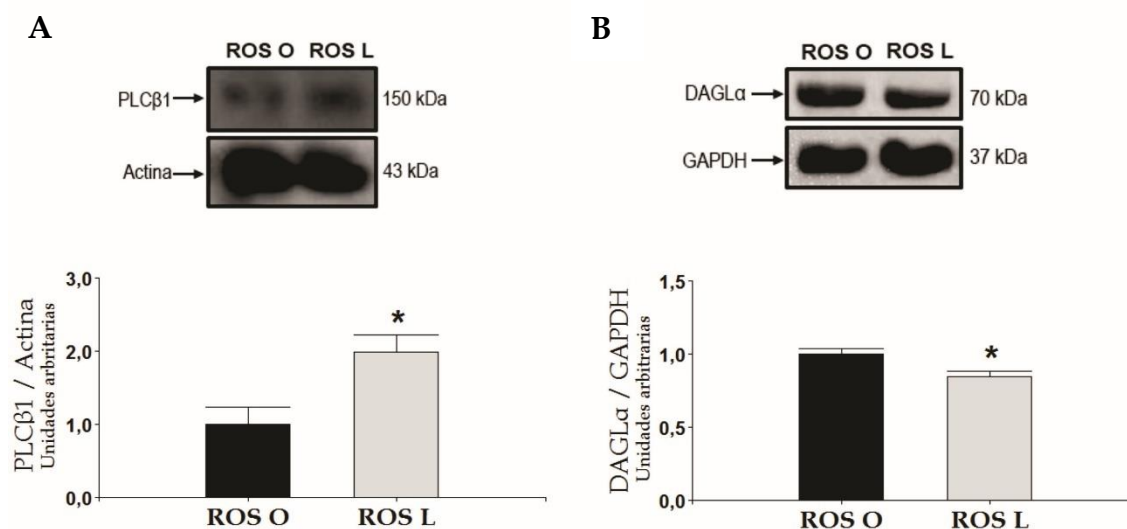


Figura 1. Efecto de la luz en los niveles de las proteínas enzimáticas PLC β 1 (A) y DAGL α (B) involucradas en la síntesis del 2-araquidonoilglicerol. El nivel de ambas proteínas fue evaluado en los segmentos externos de los bastones provenientes de retinas mantenidas en oscuridad (ROS O) o de retinas expuestas a 3000 luxes por 30 minutos (ROS L). Las enzimas mencionadas fueron detectadas mediante la técnica de WB con los anticuerpos específicos

como se detalla en la Tabla 1 (Sección 2 de Materiales y Métodos). El peso molecular de cada una de ellas lo indican los números ubicados a la derecha del WB. Los gráficos de barras muestran la densidad relativa correspondiente a los niveles de proteínas en relación con el control de carga (actina o GAPDH). Los datos fueron analizados utilizando el test estadístico *T student*. Los resultados representan la media y el error estándar ($N= 3, n= 3, *p <0.05$ con respecto a ROS O).

La Fig. 2 presenta el nivel de la enzima MAGL en condiciones de oscuridad y de luz. El nivel de la misma decreció un 30 % en ROS L comparado al nivel observado en ROS O (Fig. 2 A). Las enzimas de síntesis del 2-AG se ubican en la membrana, sin embargo la MAGL es una enzima que se localiza en el citosol y/o se asocia a la membrana (Blankman y col., 2007, Dinh y col., 2004). Por esta razón, se analizó la distribución de la enzima entre estas fracciones para determinar si se veía modificada por luz (Fig. 2 B). Para ello, se evaluó el nivel de MAGL en las fracciones de membrana y de soluble de ROS obtenidos en oscuridad (ROS O) y de ROS obtenidos en oscuridad y luego expuestos a 3000 luxes por 30 minutos (ROS B). Los resultados muestran un ligero incremento de su nivel en la fracción soluble de ROS B respecto al de ROS O.

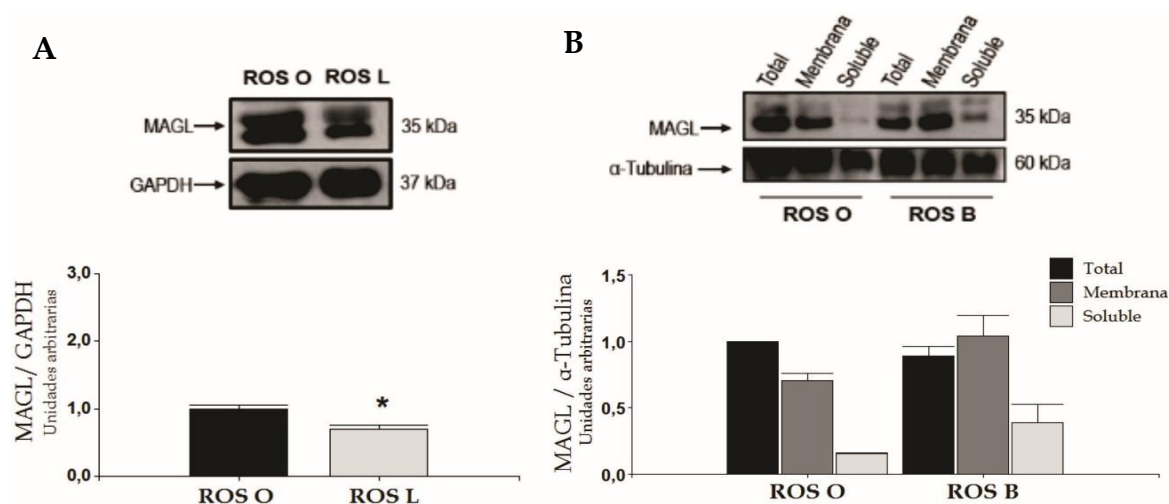


Figura 2. Efecto de la luz en el nivel de la proteína enzimática MAGL involucrada en la hidrólisis del 2-araquidonoilglicerol. El nivel de la proteína fue determinado en: (A) ROS O y

ROS L, (B) ROS O expuestos a 3000 luxes por 30 minutos (ROS B) y en las fracciones de membrana y soluble provenientes de ROS O y ROS B. Para obtener dichas fracciones, ambas preparaciones de ROS fueron centrifugados a 35 000 x g por 30 minutos. La enzima fue detectada mediante la técnica de WB con el anticuerpo específico como se detalla en la Tabla 1 (Sección 2 de Materiales y Métodos). El peso molecular de la enzima lo indica el número ubicado a la derecha del WB. Los gráficos de barras muestran la densidad relativa correspondiente al nivel de MAGL en relación con el control de carga GAPDH (A) o α -Tubulina (B). Para la detección de la enzima se emplearon para ROS O, ROS L y ROS B 100 μ g de proteína, y 80 μ g y 15 μ g de proteína de la fracción de membrana y de la fracción soluble, respectivamente. Los resultados fueron analizados utilizando una prueba T *student* y representan en (A) la media y el error estándar ($N= 3, n= 3, *p <0,05$ con respecto a ROS O) y en (B) la media y el error estándar ($N= 2, n= 2$).

2. Efecto de la luz en los niveles de las proteínas receptoras a las que se unen los cannabinoides

El nivel proteico de los receptores CB1, CB2, GPR55 y TRPV1, a los que se unen los cannabinoides, fueron medidos por la técnica de WB con anticuerpos específicos (Fig. 3). Los niveles de los receptores CB1 (Fig. 3 A) y CB2 (Fig. 3 B) se incrementaron un 87 % y un 69 % respectivamente, en ROS L respecto a ROS O. Una disminución del 30 % en el nivel de GPR55 se observó en ROS L (Fig. 3 C), no encontrándose diferencias estadísticamente significativas en el nivel del receptor TRPV1 (Fig. 3 D) entre ROS L y ROS O.

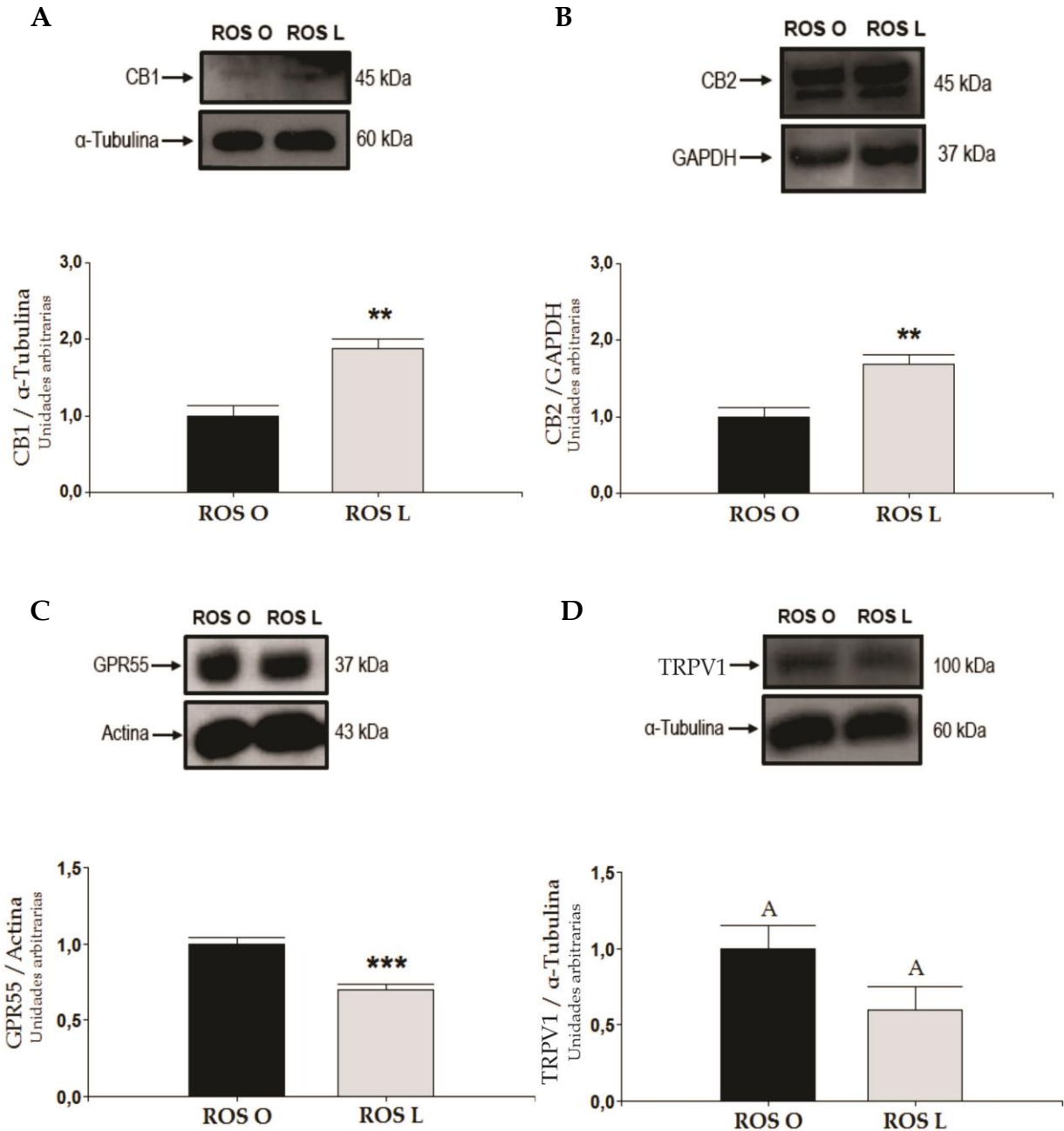


Figura 3. Efecto de la luz en los niveles de las proteínas receptoras a las que se unen los cannabinoides. El nivel proteico de los diferentes receptores fue determinado en ROS O y ROS L. CB1 (A), CB2 (B), GPR55 (C) y TRPV1 (D) fueron detectados mediante la técnica de WB con los anticuerpos específicos como se detalla en la Tabla 1 (Sección 2 de Materiales y Métodos). El peso molecular para cada uno de ellos lo indican los números ubicados a la derecha del WB. Los gráficos de barras muestran la densidad relativa correspondiente al nivel de proteína receptora en relación con el control de carga α -tubulina (A y D), GAPDH (B) y actina (C). Los datos fueron analizados utilizando una prueba T *student*. Los resultados representan la media

y el error estándar ($N=3$, $n=3$, $***p < 0,001$, $**p < 0,01$ con respecto a ROS O). Las letras similares indican que no hay diferencias significativas en las condiciones evaluadas.

3. Análisis electroforético de las proteínas de los ROS O y ROS L

El análisis del perfil proteico en ROS corroboró que en condiciones de oscuridad (ROS O) predomina la subunidad α de la transducina ($T\alpha$) (Fig. 4 A) y que el blanqueamiento de la retina (ROS L) moviliza la arrestina al segmento externo (Fig. 4 B). La Fig. 4 C muestra una disminución del 30 % de la $T\alpha$ y un incremento del 48 % de la arrestina en ROS L respecto a ROS O (Fig. 4 C).

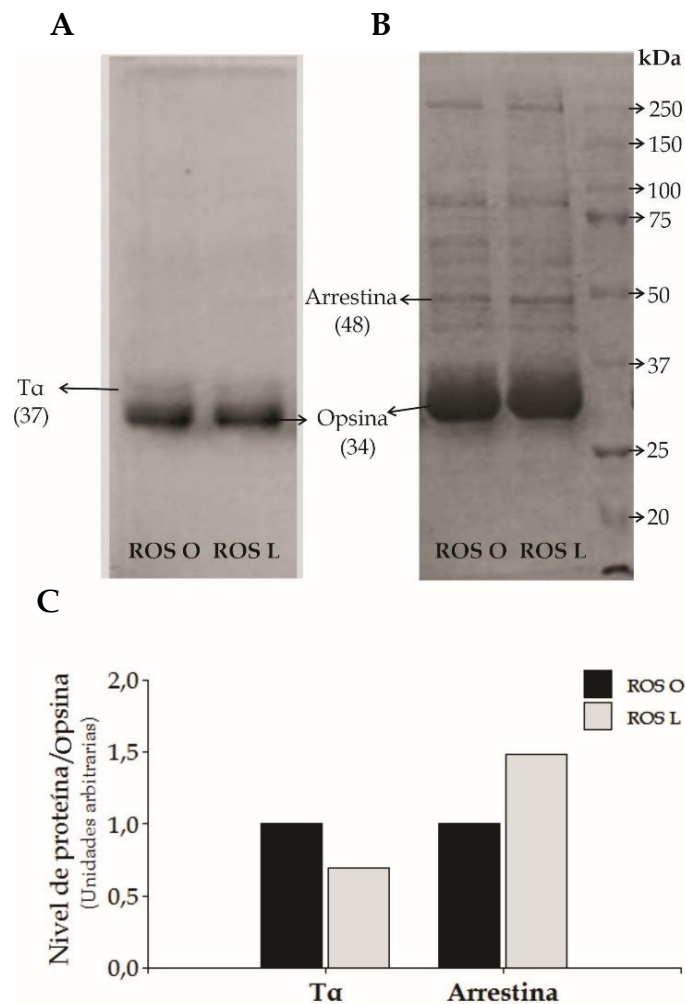


Figura 4. Efecto de la luz en los niveles de las proteínas de los ROS. Los niveles de la subunidad α de la transducina ($T\alpha$) (A) y de la arrestina (B) fueron evaluados en los segmentos externos de los bastones provenientes de retinas mantenidas en oscuridad (ROS O) o de retinas expuestas a 3000 luxes durante 30 minutos (ROS L). Estas proteínas fueron resueltas en SDS-PAGE empleando geles de acrilamida y bis acrilamida. Para los geles se emplearon 10 μ g (A) y 35 μ g (B) de proteínas. El número entre paréntesis ubicado debajo de cada proteína analizada indica su peso molecular en kDa. En (C) se representa la densidad relativa correspondiente a los niveles de las proteínas en relación a la Opsina.

4. Actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo del 2-araquidonoilglicerol

Las actividades de las enzimas de síntesis (DAGL y la LPAP) y de hidrólisis (MAGL) del 2-AG fueron ensayadas en ROS de retinas provenientes de ojos bovinos adaptados a la oscuridad (ROS O), ROS de retinas expuestas a 3000 luxes por 30 minutos (ROS L) y ROS O tratados a 3000 luxes por 30 minutos (ROS B).

4.1 Actividad de la enzima diacilglicerol lipasa y su modulación por la luz

4.1.1 Composición del diacilglicerol empleado como sustrato

Ácidos grasos	Porcentaje de ácidos grasos del [³ H] DAG
Ácido palmítico (16:0)	35
Ácido palmitoleico (16:1)	2
Ácido esteárico (18:0)	20
Ácido oleico (18:1)	19
Ácido linoleico (18:2)	1
Ácido araquidónico (20:4)	5
Ácido docosapentanoico (22:5)	1
Ácido docosahexanoico (22:6)	17

Tabla 2. Composición en acilos del [³H] DAG utilizado como sustrato en los ensayos enzimáticos de la DAGL. La composición fue determinada mediante GLC. El sustrato fue obtenido a partir de la hidrólisis de la [³H] PC de la retina bovina, como se especificó en la

sección 3 de Materiales y Métodos. Los datos representan el porcentaje de distribución de cada ácido graso en el sustrato.

El diacilglicerol utilizado para medir la actividad de la DAGL fue sintetizado a partir de [³H] PC como se muestra en la sección 3.2 de Materiales y Métodos. La composición de los ácidos grasos del [³H] DAG se presenta en la Tabla 2, en la cual se puede observar que el DAG empleado como sustrato contiene una mayor proporción de ácido palmítico (16:0) seguido del ácido esteárico (18:0), ácido oleico (18:1) y ácido docosahexanoico (22:6), representando el ácido araquidónico un 5 % del total de ácidos grasos.

4.1.2 Caracterización de la actividad de la diacilglicerol lipasa en ROS O y en ROS L

4.1.2.1 Actividad enzimática en función de la cantidad de proteínas y del tiempo de incubación

La actividad de la DAGL medida en función de la cantidad de proteínas en ROS O y ROS L se muestra en la Fig. 5 A. Esta incrementó en forma lineal hasta 300 µg y 150 µg de proteínas en ROS O y ROS L, respectivamente (Fig. 5 A). La formación de glicerol, por la acción de la enzima MAGL acoplada a la DAGL, muestra un comportamiento lineal hasta 150 µg de proteína para ambas preparaciones de ROS, siendo para esta cantidad de proteína mayor en ROS L. Sin embargo, utilizando 300 µg de proteína la producción de glicerol es similar tanto en ROS O como en ROS L (Fig. 5 B).

La Fig. 5 C presenta la actividad de DAGL en los ROS en función del tiempo de incubación. La formación del producto incrementa a partir de los 60 minutos en ROS

O mientras que en ROS L la actividad enzimática muestra un comportamiento lineal desde el primer tiempo ensayado. La formación de glicerol en ROS O y ROS L (Fig. 5 D), producto de la actividad de la enzima MAGL acoplada a DAGL, mostró una cinética similar en función del tiempo a lo observado para la producción de MAG. A partir de estos resultados se fijaron las condiciones de ensayo para DAGL en 150 μg de proteínas y 60 minutos de incubación.

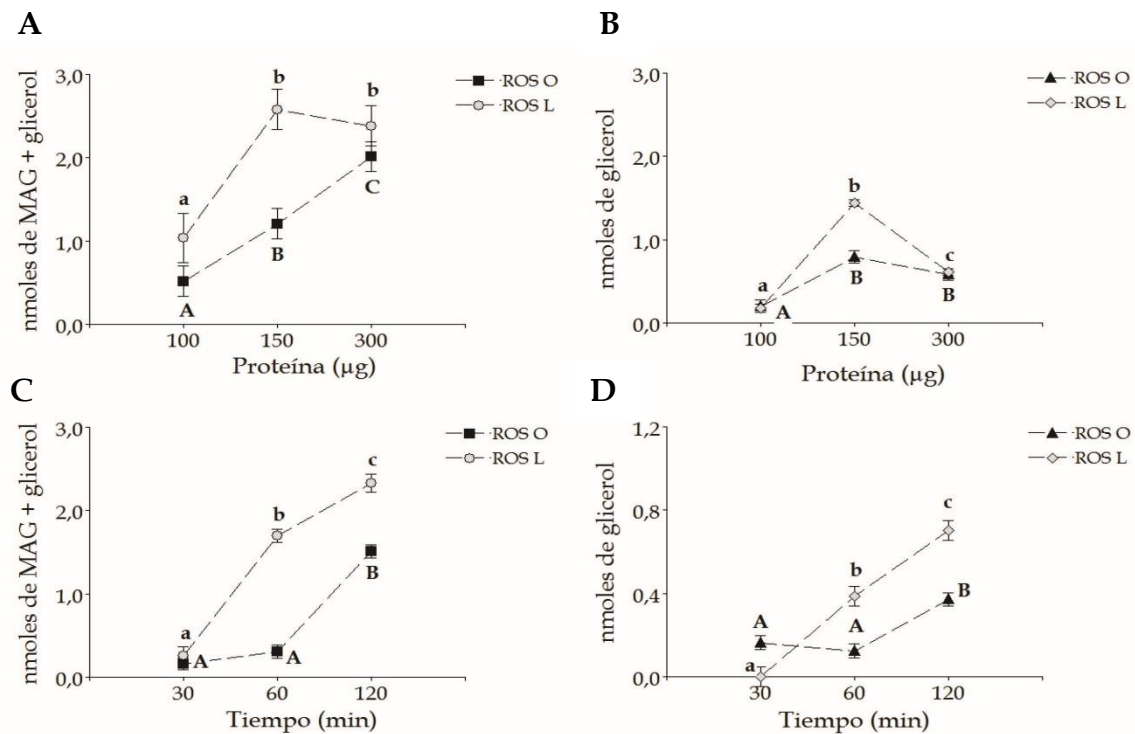


Figura 5. Actividad de las enzimas DAGL (A y C) y MAGL acoplada a DAGL (B y D) en función de la cantidad de proteínas (A y B) y del tiempo de incubación (C y D) en ROS. La actividad enzimática fue ensayada en ROS O o ROS L empleando como sustrato [^3H] DAG (2 mM, 20 000 dpm) en *buffer* MOPS 50 mM, pH 7,4 conteniendo BSA libre de ácidos grasos al 0,25 % en un volumen final de 100 μl a 37 °C. En (A y B) el tiempo de incubación fue de 60 minutos, y en (C y D) la cantidad de proteína empleada fue de 150 μg . Los ensayos fueron realizados en ROS obtenidos en primavera y otoño. Los datos fueron analizados utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, con un post test de LSD Fisher para cada una de las condiciones ensayadas. Los resultados representan la media y el error estándar de tres mediciones para cada tiempo y cantidad de proteínas y en cada condición. Las letras diferentes

en mayúscula y en minúscula representan diferencias significativas con un $p < 0,05$ en los ROS O y en los ROS L, respectivamente.

4.1.2.2 Modulación de la actividad enzimática por iones y detergentes

Datos reportados en la literatura muestran que la actividad de la enzima DAGL en sistema nervioso es modulada por iones calcio y por detergentes como el Tritón X-100 (Bisogno y col., 2003, Farooqui y col., 1986). Por esta razón, se evaluó la acción de estos agentes sobre la actividad enzimática en ROS, empleándose Tritón X-100 (0,05 %) o CaCl_2 (5 mM) (Fig. 6). La actividad de la enzima asociada a ROS disminuyó por acción del detergente, siendo el efecto inhibitorio en ROS O (66 %) y en ROS L (87 %) (Fig. 6). Un hallazgo interesante es que el Tritón X-100 inhibió la actividad de la enzima independientemente del estado de iluminación. Por otra parte, el CaCl_2 no afectó la actividad de la enzima (Fig. 6 A y B).

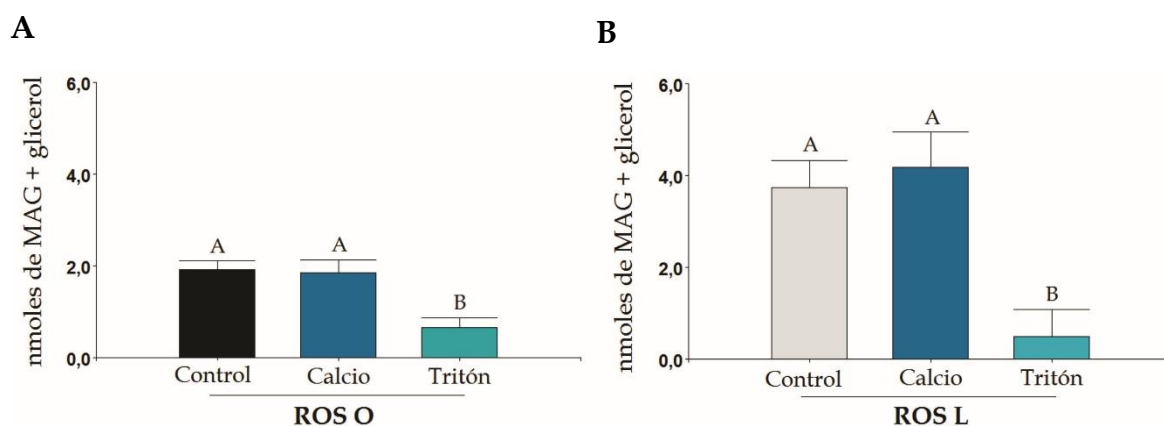


Figura 6. Modulación de la actividad de DAGL por iones y detergentes en ROS. La actividad enzimática fue ensayada en ROS O (A) y ROS L (B) (150 μg de proteína) empleando como sustrato con $[^3\text{H}]$ DAG (2 mM, 20 000 dpm) en *buffer* MOPS 50 mM, pH 7,4 conteniendo BSA libre de ácidos grasos al 0,25 %. Las incubaciones fueron hechas en presencia de calcio (CaCl_2 5 mM) o Tritón X-100 (0,05 %) en un volumen final de 100 μl , durante 60 min y a 37 °C. Los resultados fueron analizados utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, con un

post test de LSD Fisher. Las letras diferentes representan diferencias significativas con un $p < 0,05$. Los resultados representan la media y el error estándar de tres mediciones por condición.

4.1.3 Actividad de la diacilglicerol lipasa en ROS O y en ROS L en diferentes períodos del año

La Fig. 7 muestra la actividad de la enzima DAGL en ROS obtenidos en diferentes períodos del año (primavera, verano y otoño). La actividad DAGL se da en el siguiente orden otoño > primavera > verano en ROS O, y otoño ~ primavera > verano en ROS L. La actividad DAGL en ROS O es 32 % y 77 % menor en primavera y verano respecto a la actividad observada en otoño (Fig. 7 A). Por otra parte, en ROS L la disminución en la actividad de la enzima representa el 56 % en verano respecto a primavera y otoño (Fig. 7 A).

La producción de glicerol, resultado de la actividad de MAGL acoplada a DAGL, se muestra en la Fig. 7 B. En ROS O no se observa diferencia estacional. Sin embargo en ROS L la actividad de MAGL es otoño ~ primavera > verano.

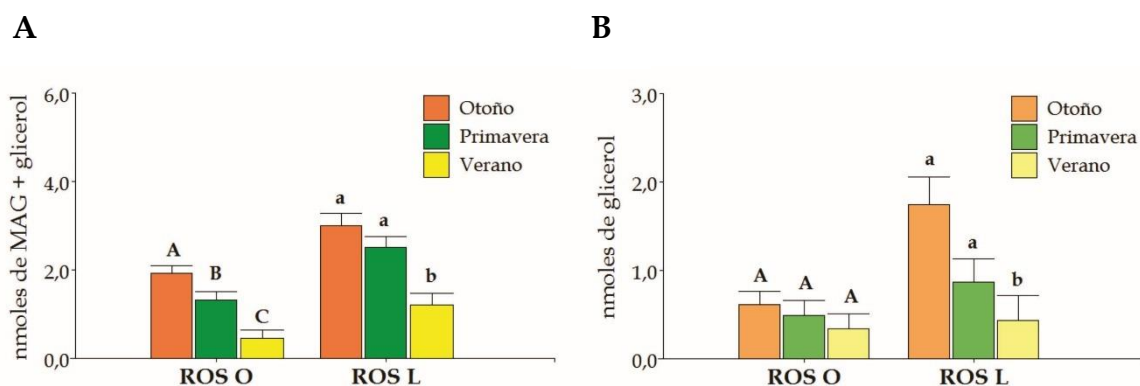


Figura 7. Actividad de las enzimas DAGL (A) y MAGL acoplada a DAGL (B) en ROS en diferentes períodos del año. La actividad enzimática fue ensayada en ROS O o ROS L (150 μ g de proteína) empleando como sustrato [3 H] DAG (2 mM, 20 000 dpm) en *buffer* MOPS 50 mM,

pH 7,4 conteniendo BSA libre de ácidos grasos al 0,25 %. Las incubaciones fueron hechas en un volumen final de 100 μ l, durante 60 min y a 37 °C. Los experimentos fueron realizados en los meses de mayo (otoño), septiembre-octubre (primavera) y diciembre-enero (verano). Los resultados fueron analizados utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, con un post test de LSD Fisher. Los resultados representan la media y el error estándar de seis mediciones de dos experimentos por estación. Las letras diferentes en mayúscula y en minúscula representan diferencias significativas con un $p < 0,05$ en los ROS O y los ROS L, respectivamente.

4.1.4 Actividad de la diacilglicerol lipasa en ROS bajo diferentes condiciones de iluminación

La actividad de la DAGL fue medida en ROS provenientes de retinas mantenidas en oscuridad (ROS O), retinas expuestas a 3000 luxes durante 30 minutos (ROS L) y ROS obtenidos en oscuridad (ROS O) y luego expuestos a 3000 luxes durante 30 minutos (ROS B). La actividad de la DAGL presentó un incremento del 103 % en ROS L (Fig. 8 A) y del 154 % en ROS B (Fig. 8 B) respecto a ROS O.

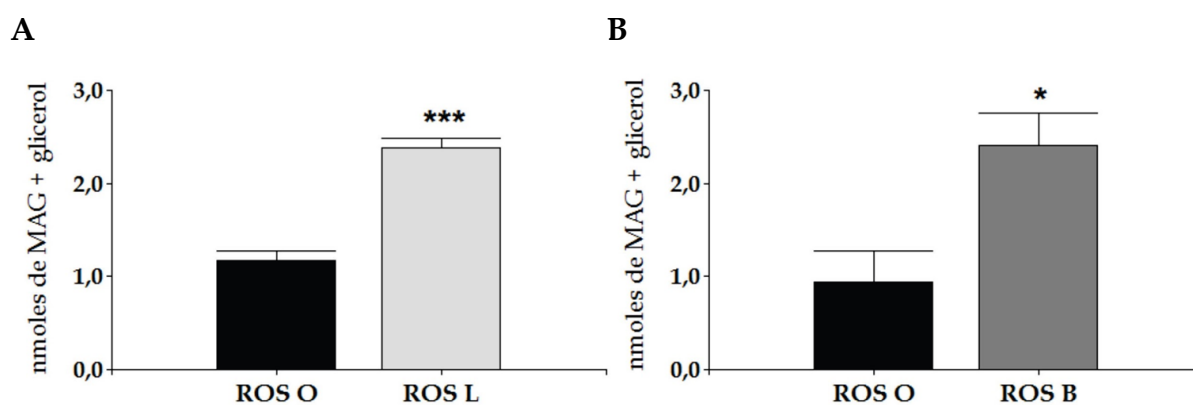


Figura 8. Actividad de la DAGL en ROS bajo diferentes condiciones de iluminación. La actividad enzimática fue ensayada en ROS O, ROS L (A) y en ROS O sometidos a una iluminación de 3000 luxes por 30 minutos (ROS B) (B). La actividad enzimática se determinó empleando 150 μ g de proteína de las diferentes preparaciones de ROS y como sustrato [3 H] DAG (2 mM, 20 000 dpm) en *buffer* MOPS 50 mM, pH 7,4 conteniendo BSA libre de ácidos grasos al 0,25 %. Las incubaciones fueron hechas en un volumen final de 100 μ l, durante 60 min y a 37 °C. Para el análisis estadístico, cada pool fue considerado como un bloque debido a las

diferencias observadas en la actividad de las diferentes épocas del año. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) en bloque aleatorizado, con un post test de LSD Fisher. Los resultados representan la media y el error estándar para **A** ($N = 4, n = 12, ***p < 0,001$ con respecto a ROS O) y para **B** ($N = 3, n = 6, *p < 0,05$ con respecto a ROS O).

4.2 Actividad de la enzima lisofosfatidato fosfohidrolasa y su modulación por la luz

La actividad de LPAP fue ensayada empleando como sustrato 1-[9,10-³H] oleoil-LPA generándose [³H] oleoilglicerol (MAG) y [³H] oleato.

4.2.1 Caracterización de la actividad de la lisofosfatidato fosfohidrolasa en ROS O y ROS L

4.2.1.1 Actividad enzimática en función de la cantidad de proteínas

La actividad de la LPAP fue medida en función de la cantidad de proteínas en ROS O y ROS L (Fig. 9). La formación de ambos productos, MAG (Fig. 9 A) y oleato (Fig. 9 B), fue similar en el rango de proteínas ensayado. A partir de este resultado se fijó en 100 µg el contenido de proteínas para el ensayo de la LPAP.

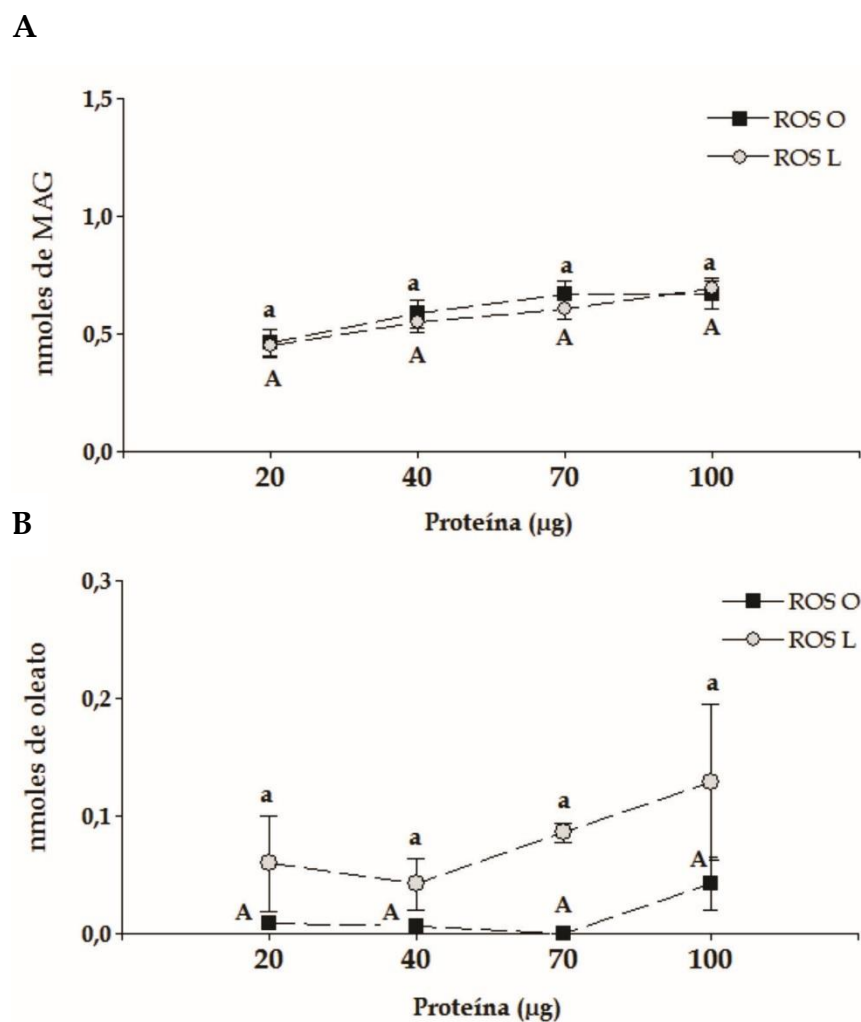


Figura 9. Actividad de la LPAP en función de la cantidad de proteínas. La actividad enzimática fue ensayada en ROS O o ROS L empleando como sustrato 1-[9,10-³H]oleoil-LPA (20 µM, 6000 dpm) y 1-oleoil LPA frío en BSA al 0,1 %, en *buffer* Tris-HCl 100 mM pH 7,4 conteniendo DTT 1,2 mM y EDTA 2 mM, en un volumen final de 100 µl a 37°C. Previo al agregado del sustrato, los ROS (100 µg de proteína) se preincubaron con una solución de NEM 4,4 mM en el mismo *buffer* de ensayo por 10 minutos. La reacción enzimática fue finalizada después de 15 minutos de incubación. Las gráficas muestran la producción de MAG (A), y de oleato (B). Los datos fueron analizados utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, con un post test de LSD Fisher para cada una de las condiciones ensayadas. Los resultados para ambas condiciones representan la media y el error estándar de tres mediciones por cantidad de proteína. Las letras similares en mayúscula indican que no hay diferencias significativas entre las distintas cantidades de proteínas en los ROS O y en minúsculas en los ROS L.

4.2.2 Actividad de la lisofosfatidato fosfohidrolasa en ROS bajo diferentes condiciones de iluminación

La Fig. 10 presenta la actividad de la enzima en ROS O, ROS L y ROS B. La formación de ambos productos, MAG (A y C) y oleato (B y D) no mostraron diferencias significativas en todas las condiciones evaluadas.

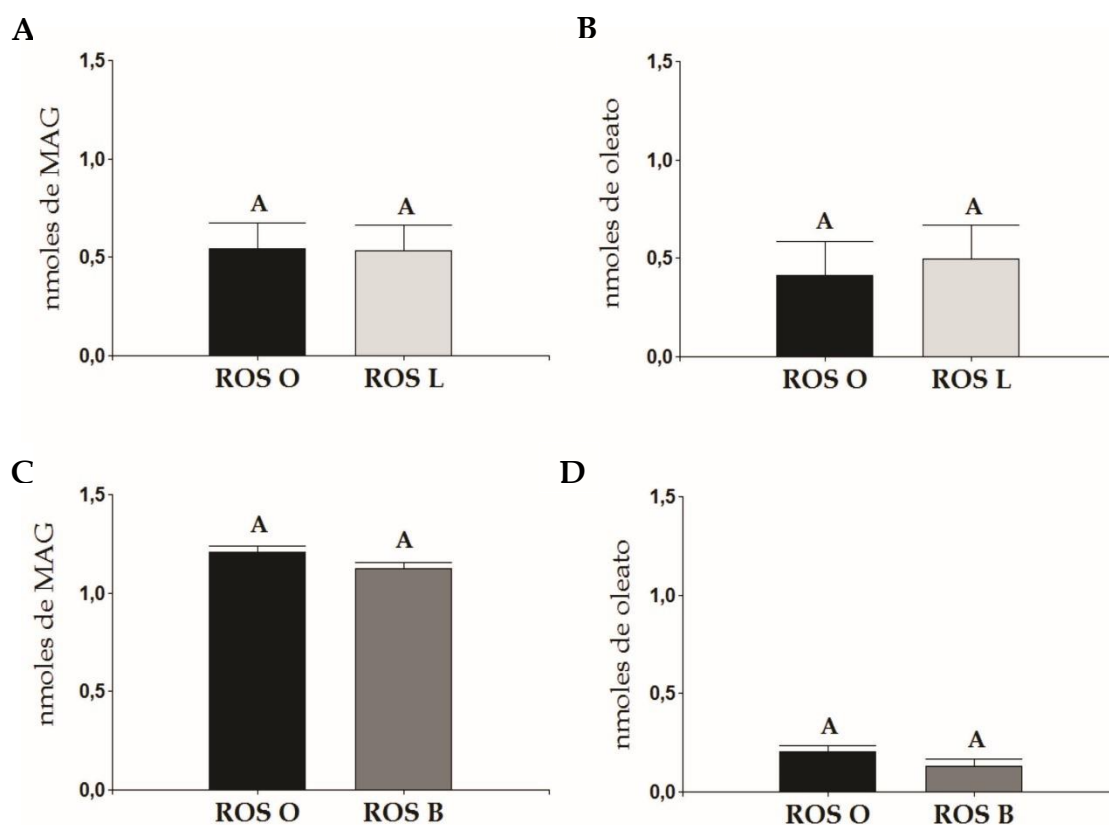


Figura 10. Actividad de la LPAP en ROS bajo diferentes condiciones de iluminación. La actividad enzimática fue ensayada en ROS O, ROS L y en ROS O sometidos a una iluminación de 3000 luxes durante 30 minutos (ROS B). Se empleó como sustrato 1-[9,10-³H]oleoil-LPA (20 μ M, 6000 dpm) y 1-oleoil LPA frío en BSA al 0,1 % en *buffer* Tris-HCl 100 mM pH 7,4 conteniendo DTT 1,2 mM y EDTA 2 mM, en un volumen final de 100 μ l a 37°C. Previo al agregado del sustrato, los ROS (100 μ g de proteína) se preincubaron con una solución de NEM 4,4 mM en el mismo *buffer* de ensayo por 10 minutos. La reacción enzimática fue finalizada después de 15 minutos de incubación. Las gráficas muestran la producción de MAG (A y C) y de oleato (B y D). Los datos fueron analizados utilizando una prueba T *student*. Los resultados representan la media y el error estándar ($N = 3$, $n = 9$). Las letras similares indican que no hay diferencias significativas.

4.3 Actividad de la monoacilglicerol lipasa y su modulación por luz

4.3.1 Composición del monoacilglicerol empleado como sustrato

El monoacilglicerol utilizado para medir la actividad de la MAGL fue sintetizado a partir de [³H] TAG como se muestra en la sección 3.3 de Materiales y Métodos. La composición de los ácidos grasos del [³H] MAG se presenta en la Tabla 3, en la cual se puede observar que este lípido está compuesto principalmente por ácido palmítico (16:0) y ácido esteárico (18:0), representando el ácido oleico (18:1) y el ácido araquidónico (20:4) un 11 % cada uno del total de los ácidos grasos del sustrato.

Ácidos grasos	Porcentaje de ácidos grasos del [³ H] MAG
Ácido palmítico (16:0)	46
Ácido palmitoleico (16:1)	1
Ácido esteárico (18:0)	26
Ácido oleico (18:1)	11
Ácido linoleico (18:2)	2
Ácido α -Linolénico (18:3)	1
Ácido dihomo-gamma-linolénico (20:3)	1
Ácido araquidónico (20:4)	11

Tabla 3. Composición en acilos del [³H] MAG utilizado como sustrato para los ensayos enzimáticos de la MAGL. La composición fue determinada mediante GLC. El sustrato fue obtenido a partir de la hidrólisis del [³H] TAG de la retina bovina, como se especificó en la sección 3.3 de Materiales y Métodos. Los datos representan el porcentaje de distribución de cada ácido graso en el sustrato.

4.3.2 Caracterización de la actividad de la monoacilglicerol lipasa

4.3.2.1 Actividad enzimática en función de la cantidad de proteínas

La actividad de MAGL fue medida en función de la cantidad de proteínas en ROS O y ROS L (Fig. 11). La mayor actividad enzimática en ROS O se observó a 100 μg de proteína, mientras que en ROS L fue similar en todo el rango de proteínas ensayado (Fig. 11). A partir de este resultado se fijó la condición de ensayo para MAGL en 100 μg de proteínas.

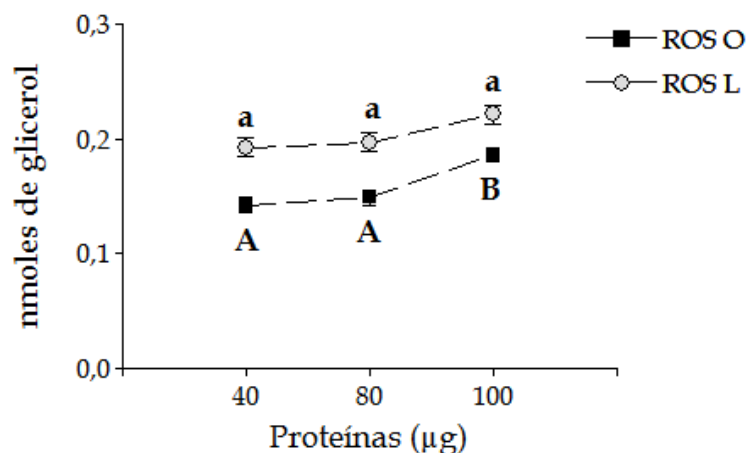


Figura 11. Actividad de la MAGL en función de la cantidad de proteínas. La actividad de la MAGL fue ensayada incubando ROS en presencia de $[^3\text{H}]$ MAG 10 μM (2500 dpm) en *buffer* Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) conteniendo EDTA 1 mM en un volumen final de 100 μl durante 15 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$. El sustrato fue preparado en BSA libre de ácidos grasos 1,25 mg/ml. Los datos fueron analizados utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, con un post test de LSD Fisher para cada una de las condiciones ensayadas. Los resultados para ambas condiciones representan la media y el error estándar de tres mediciones por cantidad de proteína. Las letras mayúsculas diferentes representan diferencias significativas en ROS O con un $p < 0,05$.

4.3.3 Actividad de la monoacilglicerol lipasa en ROS bajo diferentes condiciones de iluminación

La Figura 12 presenta la actividad de la enzima en ROS O, ROS L y ROS B. Los resultados empleando MAG exógeno muestran un incremento en la actividad enzimática (69 %) sólo cuando se aplica el estímulo lumínico a la retina (ROS L) (Fig. 12 A).

El MAG formado por la actividad de la DAGL es adicionalmente metabolizado a glicerol. Por esta razón se evaluó la actividad de MAGL acoplada a DAGL en las tres preparaciones de ROS (Fig. 12 C y D). El incremento observado en la actividad de MAGL en ROS L respecto a ROS O es aparente ya que los porcentajes de formación de MAG (63 %) y glicerol (37 %) con respecto a la degradación total de DAG fueron similares en ambas condiciones (Fig. 12 E). Sin embargo, en ROS B el porcentaje de formación de glicerol fue ligeramente menor (44 %) respecto al glicerol formado en ROS O (55 %) (Fig. 12 F).

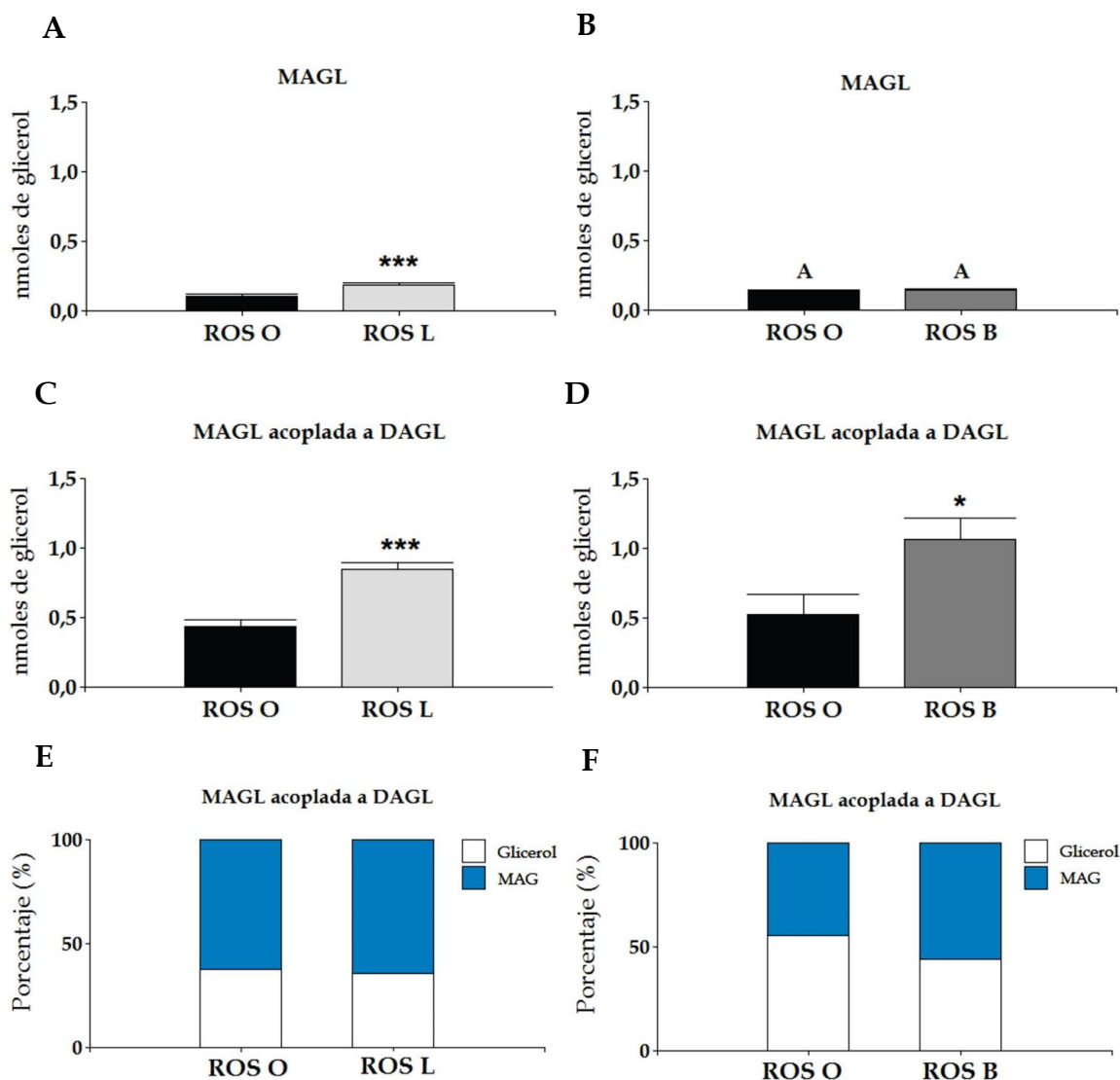


Figura 12. Actividad de la MAGL en ROS bajo diferentes condiciones de iluminación. La actividad de la MAGL fue ensayada incubando ROS en presencia de $[^3\text{H}]$ MAG agregado exógenamente (A, B) o de $[^3\text{H}]$ MAG generado endógenamente a partir de la hidrólisis de DAG por acción de la DAGL (C, D). El porcentaje de distribución del MAG y glicerol generado por la actividad de la DAGL y la MAGL acoplada a esta enzima está representado en los paneles E y F. En (A) el ensayo se realizó empleando $[^3\text{H}]$ MAG 10 μM (2500 dpm) en *buffer* Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) conteniendo EDTA 1 mM en un volumen final de 100 μl durante 15 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$. El sustrato fue preparado en BSA libre de ácidos grasos 1,25 mg/ml. El contenido de $[^3\text{H}]$ MAG en los ensayos fue de 11 μM en ROS O y 24 μM en ROS L y ROS B (C y D), siendo las condiciones de incubación las que se especifican para DAGL. Los datos fueron analizados utilizando una prueba *T student* (A, B) y un análisis de varianza (ANOVA) en bloque aleatorizado, con un post test de LSD Fisher (C, D). Los resultados representan la media y el error estándar para (A, B) ($N = 3$, $n = 9$, $***p < 0,001$), para (C) ($N = 4$, $n = 12$, $***p < 0,001$) y para (D) ($N = 3$, $n = 6$, $*p < 0,05$).

DISCUSIÓN

La retina es una extensión del sistema nervioso central cuya función primaria es el procesamiento de la luz y el color capturado por los fotorreceptores. Esta información es transmitida a la corteza visual y es procesada en orden de generar una imagen visual. El segmento externo de la célula fotorreceptora es el responsable de iniciar el evento de la visión en respuesta a estímulos lumínicos, contiene distintas proteínas que están involucradas en el mecanismo de detección de la luz y en la generación de la señalización visual (Arshavsky y col., 2012, Fain y col., 2001). La presencia y la localización del SEC (endocannabinoides, receptores y enzimas) ha sido estudiada en retina de varias especies (de salamandra a primates, y humanos) principalmente por técnicas de inmunohistoquímica (Bouskila y col., 2016, Cecyre y col., 2014, Cecyre y col., 2013, Straiker y col., 2003, Straiker y col., 1999). Estos estudios sugieren una participación del SEC en el proceso visual, sin embargo, al inicio de esta Tesis, las investigaciones no se habían enfocado en dilucidar como la disponibilidad de EC y como los receptores a los que estos se unen responden al estímulo lumínico.

Los resultados de esta Tesis demuestran la presencia de diferentes elementos del SEC en el ROS y cómo éstos son regulados por la luz (Esquema 15).

Varios EC han sido identificados entre los cuales la AEA y el 2-AG son los más estudiados (Iannotti y col., 2016). Los principales resultados del capítulo I de este trabajo de Tesis se focalizan en el metabolismo del 2-AG desde la perspectiva de las enzimas responsables de su síntesis e hidrólisis y de su regulación por luz. La principal

ruta metabólica para la síntesis del 2-AG involucra la acción combinada de las enzimas PLC y DAGL (Stella y col., 1997, Prescott y Majerus, 1983). Los resultados de esta Tesis muestran que el nivel de la isoforma PLC β 1 incrementa en los ROS de retinas expuestas a la luz respecto a aquellos de retinas adaptadas a la oscuridad. Otras isoformas de la PLC como la PLC β 4 (Peng y col., 1997) y la PLC γ 1 (Ghalayini y col., 1998) se han identificado en los ROS de retinas bovinas. Ghalayini y col. (1998) demostraron que la isoforma PLC γ 1, se encuentra mayormente expresada en los ROS de retinas expuestas a baja intensidad lumínica (15 -20 luxes) observándose además un estímulo en su actividad bajo esta condición (Ghalayini y col., 1998). Otros trabajos demuestran que la PLC específica para PIP₂ es activada por luz en retinas y en ROS de distintas especies (Ghalayini y col., 1998, Millar y col., 1988, Hayashi y Amakawa, 1985, Ghalayini y Anderson, 1984). Estudios en retinas bovinas describen a esta enzima asociada a la membrana y a la fracción soluble del ROS (Ghalayini y col., 1991), además de su interacción y regulación por la arrestina, una de las proteínas involucradas en la finalización del proceso visual (Ghalayini y Anderson, 1992). La activación de la PLC en los fotorreceptores parece cumplir un rol en la desensibilización/ adaptación del fotorreceptor a la luz (Ghalayini y col., 1998). En concordancia con esto se ha demostrado que la translocación de la arrestina se iniciaría por una cascada de señalización que involucra la vía de PLC y PKC (Orisme y col., 2010).

El PIP₂, al ser hidrolizado por la PLC, libera los segundos mensajeros inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y DAG. El primero conduce a la liberación de Ca²⁺ intracelular y el

último podría activar algunas isoformas de la proteína quinasa C (PKC) (Kang y col., 2012). El DAG, formado por la acción de la PLC, puede ser hidrolizado por la DAGL dando origen al 2-AG, que a su vez puede ser degradado principalmente por la MAGL. Esto produciría la disminución de la señal del mensajero DAG e iniciaría una nueva señalización mediada por el 2-AG la cual puede ser finalizada por su hidrólisis. Nuestros resultados muestran la expresión de la isoforma α de DAGL con un peso molecular de ~ 70 kDa en los ROS. Dos isoformas de la DAGL (α y β) que hidrolizan el ácido graso de la posición *sn*-1 de DAG han sido clonadas y caracterizadas en cerebro humano (Bisogno y col., 2003). Los pesos moleculares descritos para la DAGL α y DAGL β son de ~ 120 y ~ 70 kDa, respectivamente. Nuestros resultados solo evidencian la isoforma DAGL α , sin embargo, el peso molecular no se corresponde con lo descrito en la bibliografía ya que esta isoforma, en nuestras preparaciones, presenta un peso molecular de ~ 70 kDa. Los genes que codifican para ambas isoformas de DAGL fueron encontrados en un amplio rango de especies (pollo, pez cebra y ratón) con un alto grado de conservación (Bisogno y col., 2003). Sin embargo a la fecha estas isoformas no han sido reportadas en la especie bovina. Los trabajos de Farooqui y col. (1989) y Leung y col. (2008), evidencian cierta diversidad de pesos moleculares para la DAGL (Leung y col., 2008, Farooqui y col., 1989). Los primeros autores observaron, a partir de homogenados de cerebro bovino, dos isoformas de la enzima con pesos moleculares correspondientes a ~ 27 y ~ 52 kDa, asociadas a microsomas y membrana plasmática, respectivamente. Por otro lado, Leung y col. (2008) han descrito, en fotorreceptores

de *Drosophila*, dos isoformas de DAGL presentando pesos moleculares de ~70 y ~110 kDa. Estas muestran un 50 % de homología con cada una de las respectivas isoformas humanas (Leung y col., 2008). El hecho que el peso molecular observado para la DAGL de ROS bovino y para la descrita en fotorreceptores de *Drosophila* sean coincidentes, podrían indicar que se trata de isoformas de la enzima específicas del sistema visual tanto en vertebrados como en invertebrados.

Los resultados de esta Tesis también muestran que el blanqueamiento de la retina disminuye los niveles proteicos de DAGL α y de MAGL en los ROS probablemente por migración de estas del ROS al RIS. En apoyo a esta posibilidad se ha visto que la DAGL es una proteína integral de membrana que contiene una secuencia en su carboxilo terminal PPxxF (prolina, prolina, otros aminoácidos y fenilalanina) que permite su unión a proteínas Homer (Reisenberg y col., 2012). Estas son indicadas como responsables del reciclado de la enzima y de regular sus niveles en la superficie celular (Zhou y col., 2016). En este sentido se ha observado, en una línea celular de neuroblastoma, que la DAGL α co-inmunoprecipita con Homer 2 a (Jung y col., 2007), y que, en neuronas hipocampales, colocaliza con Homer-1, siendo endocitada desde la membrana y reciclada hacia la membrana postsináptica (Zhou y col., 2016). Por otra parte, en una línea celular del ganglio de la raíz dorsal fue localizada la DAGL α en balsas lipídicas, junto con su sustrato, DAG, y su producto, 2-AG (Rimmerman y col., 2008).

La MAGL es una enzima asociada a membrana y también de localización citosólica (Blankman y col., 2007, Dinh y col., 2004). La estructura cristalizada de la MAGL humana reveló que es una enzima anfitrófica debido a la presencia de una hélice hidrofóbica. Esta hélice le permite a la MAGL soluble anclarse a la membrana para acceder al sustrato lipofílico (Labar y col., 2010). Los resultados de este trabajo indican que la distribución de la MAGL entre la membrana y el soluble del ROS se ve aparentemente modificada por luz, observándose un incremento de su nivel en el soluble de ROS B (ROS aislados en oscuridad y luego expuestos a luz). Si bien esto puede ser indicativo de patrones de redistribución de la MAGL desde la membrana a la fracción soluble inducido por estímulo lumínico, el aumento de la proteína en el soluble no se condice con su pérdida desde la membrana. Esto podría explicarse dado el mayor contenido de proteínas en la fracción de membrana respecto al soluble, y por lo tanto variaciones mínimas en el nivel de cualquier proteína de membrana sería difícil de detectar.

La expresión del receptor CB1 en diferentes células de la retina, incluyendo los fotorreceptores, de diferentes especies (mono, ratón, rata, pollo, salamandra y pez dorado) ha sido demostrada por técnicas de inmunohistoquímica (Straiker y col., 2003, Yazulla y col., 2000, Straiker y col., 1999). Por otro lado, estudios de Bouskila y col. (2016) indican la presencia del receptor CB2 en las células de Müller en la retina de primates, mostrándose una distribución variable en las capas retinales de roedores y musarañas (Bouskila y col., 2016). La localización y distribución de los receptores CB1

y CB2 en retina bovina y/o en células fotorreceptoras de esta especie se desconocía hasta el inicio de este trabajo de Tesis, siendo el mismo el primer reporte de la presencia de dichos receptores en el segmento externo de los bastones de retina bovina. Los resultados aquí presentados revelan no solo la presencia de los receptores CB1 y CB2 en ROS sino también el incremento en sus niveles de expresión en el estado iluminado de la retina. El movimiento de proteínas en la célula fotorreceptora desde su lugar de síntesis en el RIS hacia el ROS, lugar donde ocurre la fototransducción, es un campo aun explorable. La rodopsina tiene una secuencia en su carboxilo terminal que permite ser reconocida por proteínas de transporte que la movilizan a través del cilio conector hasta llegar al ROS (Deretic, 2006, Deretic y col., 2005). Aproximadamente 2000 moléculas de opsina son transportadas del RIS al ROS por minuto (Insinna y Bersharse, 2008). Los receptores CB1 y CB2 son proteínas integrales de membrana, consecuentemente, su transporte podría ser análogo a lo que ocurre con la opsina y otras proteínas de los ROS (Pearing y col., 2013, Huttl y col., 2005, Tam y col., 2004). El incremento en los niveles proteicos de los receptores CB1 y CB2 inducido por luz puede ser indicativo del transporte de estos receptores hacia los ROS en respuesta a la disponibilidad incrementada del 2-AG bajo esta condición. En soporte a esto, ha sido reportado que la redistribución de arrestina y la T α entre el RIS y el ROS por luz es acompañado por un flujo de proteínas entre estos compartimentos (Pearing y col., 2013). Esto concuerda con los resultados presentados en esta Tesis, donde se observa un aumento en el nivel de arrestina y una disminución en el de T α en ROS provenientes

de retinas iluminadas (Fig. 4), lo que sugiere un movimiento activo de diferentes proteínas durante el tiempo de iluminación ejercido sobre la copa del ojo. Por otro lado, Imamura y col. (2017) empleando una línea celular de conos 661W observaron la translocación intracelular del CB1 desde la membrana plasmática después de la inducción de daño por exposición a la luz (Imamura y col., 2017). Es importante aclarar que la luz ejercida sobre la copa del ojo (3000 luxes) y el tiempo de exposición (30 min) no generan daño en la retina. Esto fue evaluado por otros integrantes de nuestro laboratorio quienes valoraron distintos parámetros de daño. Así observaron que los niveles de peroxidación lipídica, midiendo la formación de TBARS, en retinas bajo idénticas condiciones de estímulo a las empleadas en este trabajo, eran similares a los encontrados en las retinas mantenidas en oscuridad. También pudieron determinar, por tinción de los núcleos de las células retinales con yoduro de propidio, que la luz no indujo la fragmentación del ADN, patrón característico de daño que conduce a la apoptosis (Natalini, 2014). Aunando lo descrito acerca del movimiento activo de diferentes proteínas por estímulo de luz y la capacidad de translocación del receptor CB1 con los resultados de esta Tesis, se puede sugerir un movimiento activo de los receptores CB hacia el ROS bajo nuestras condiciones de iluminación.

Esta Tesis demuestra que la luz modula los niveles proteicos de otro de los receptores que responde a cannabinoides, el GPR55, cuya expresión disminuye bajo el estado de iluminación de la retina. Bouskila y col. (2013) han descrito la expresión del GPR55 con predominio en el RIS de los bastones de retinas de primates, sugiriendo su

función en la visión escotópica (Bouskila y col., 2013). Bouskila y col. (2016) proponen que la activación del GPR55 del RIS, acoplado a $G\alpha_{13}$, por lisofosfatidilglucósido desencadena una cascada de señalización que conduce al estímulo de RhoA, la proteína quinasa asociada a Rho (ROCK), de la fosfolipasa C (PLC) y a la apertura de los canales de Na^+ / Ca^{2+} resultando en la despolarización de la membrana (Bouskila y col., 2016). Es importante resaltar que en el proceso de fototransducción la absorción de un solo fotón disminuye la corriente de iones e hiperpolariza la membrana plasmática del bastón, generando una disminución en la liberación de glutamato (Molday y col., 2015) (Esquema 16 B). Sin embargo, la translocación de la arrestina y de la $T\alpha$ que se observa en nuestro modelo de estímulo lumínico sobre la copa del ojo, estaría indicando un proceso de adaptación a la luz por parte del fotorreceptor, dado que la translocación de la arrestina al ROS es una forma de acelerar la inactivación de la metarodopsina II y en consecuencia de disminuir la primera etapa de la amplificación de la fototransducción (Schubert y col., 1999). Por otro lado, la disminución de la $T\alpha$ en el ROS, que sucede cuando se agota su capacidad para hidrolizar GTP, reduce la activación de la PDE (Lobanova y col., 2007). Así, el estímulo de luz ejercido sobre la copa del ojo interrumpiría la circulación de iones por el cierre de los canales en el ROS generando la máxima hiperpolarización del mismo, y en consecuencia su saturación. Los fotorreceptores tienen la capacidad para responder a un incremento en el flujo incidente de fotones y así evitar su saturación, esto permite al fotorreceptor adaptarse a diferentes niveles de luz ambiental ajustando la amplificación de la cascada de

fototransducción y la tasa de recuperación de los niveles de GMPc (Arshavsky y Burns, 2012). Lo enunciado precedentemente junto a la translocación de la arrestina y la $T\alpha$ observada en nuestro modelo de estímulo lumínico sobre la copa del ojo nos lleva a sugerir que la disminución del GPR55 observada en el ROS se debería a la posible migración hacia el RIS donde su activación generaría un incremento en el Na^+ - Ca^{2+} intracelular por la apertura de los canales de Na^+ / Ca^{2+} , ayudando a mantener el tono del glutamato y/o participando en la finalización del proceso de fototransducción (Esquema 16 C). Según lo propuesto acerca de la función del GPR55, en el RIS, y la localización casi exclusiva de los canales CNG y el intercambiador NCKX1 en el ROS, es que proponemos que el GPR55 desde el RIS podría cumplir su rol en el proceso visual.

Otro receptor evaluado en esta Tesis con capacidad de unir cannabinoides es el TRPV1, cuyo nivel no se ve modificado por luz. Existe una estrecha relación entre el TRPV1, las corrientes de Ca^{2+} y el proceso visual. Esto se debe a que el TRPV1 es un canal de liberación de Ca^{2+} intracelular (Turner y col., 2003), los niveles de Ca^{2+} son modificados por la luz, y este catión es el principal conductor del tono de la neurotransmisión que caracteriza la señalización retinal (Krizaj y Copenhagen, 2002). El TRPV1 podría regular la disminución de Ca^{2+} intracelular producido por el cierre de los canales CNG y la continua extracción de este ión por NCKX1 que se da en respuesta a la luz en el ROS. Se ha encontrado que AEA y 2-AG, ligandos de TRPV1, pueden tener un rol protector frente a la injuria isquémica y excitotoxicidad (Sappington y col.,

2015, Ward y col., 2014, Ho y col., 2012, Sappington y col., 2009, Nucci y col., 2007). Por lo tanto, la presencia del TRPV1 en los ROS podría llegar a contribuir a su protección frente algún factor de estrés como un exceso o prolongación del estímulo lumínico.

Este trabajo de Tesis demuestra no sólo la existencia de las enzimas relacionadas con el metabolismo del 2-AG sino también su actividad, cuyo balance podría contribuir a una mayor biodisponibilidad de este endocannabinoide en ROS.

La actividad de DAGL fue ensayada empleando como sustrato un DAG que contenía ácidos grasos saturados más monoenoicos (76 %) y polienoicos (24 %), entre estos últimos el ácido araquidónico representaba el 5 % (Pascual y col., 2013, Pasquare de García y col., 1986). Si bien el sustrato presenta un bajo contenido de 20:4, investigaciones previas demostraron que esta enzima en sistema nervioso es activa frente a un DAG con una composición similar al empleado en esta Tesis y que su actividad no se diferencia con un DAG constituido principalmente por 18:0/20:4 (Rosenberger y col., 2007).

Los requerimientos en cuanto a la cantidad de proteínas y al tiempo de incubación de las enzimas del metabolismo del 2-AG nos permitió establecer las condiciones de operatividad para las mismas.

Dado que los datos bibliográficos hacen referencia a la regulación de la DAGL de cerebro bovino y de las isoformas α y β clonadas en humanos por calcio y tritón (Bisogno y col., 2003, Farooqui y col., 1986) es que la actividad de la enzima fue

ensayada en los ROS en presencia de estos agentes. La actividad de DAGL no fue afectada por calcio en las dos condiciones evaluadas (ROS O y ROS L). Sin embargo, el detergente no iónico, Tritón X-100 la inhibe independientemente del estado de iluminación del ROS. Debido a que los ROS tienen un contenido membranoso alto aportado por los discos que lo componen además de la membrana plasmática y que la DAGL es una proteína intrínseca de membrana, el Tritón-X100 al desestructurar la membrana podría estar afectando la acción catalítica de la enzima. Resultados similares fueron encontrados por otros autores al evaluar la actividad de la enzima en membrana plasmática de cerebro bovino (Farooqui y col., 1986). A diferencia de nuestros resultados, Bisogno y col. (2003) mostraron que las dos isoformas (α y β) de la DAGL clonadas de cerebro humano son estimuladas por calcio (Bisogno y col., 2003). Por otra parte, se describió en cerebro bovino, que la DAGL asociada al retículo endoplásmico incrementa su actividad a partir de 10 mM de CaCl_2 o utilizando 0,1 % de Tritón X-100 (Farooqui y col., 1986), pero estas concentraciones exceden a las empleadas en nuestros ensayos.

Como puede observarse en la sección 4.1.3 de Resultados la actividad de la DAGL y la de MAGL, acoplada a esta, presentan variaciones dependiendo de la época del año en que se obtienen las retinas. Las diferencias luz-oscuridad observadas en la actividad de DAGL en otoño y primavera desaparecen en la época de verano. Es importante considerar que el sacrificio de los animales, previo a la obtención de los ojos, ocurre en las primeras horas de la mañana, además de los horarios en que

amanece en las diferentes épocas del año (verano (5:48 am (\pm 0:09 h), primavera (6:49 am (\pm 0:25 h) y otoño (7:56 am (\pm 0:06 h)). Consecuentemente, la actividad de la DAGL podría haber estado afectada por una mayor exposición a la luz solar de los ojos bovinos *in vivo* previo a su enucleación y posterior adaptación a la oscuridad realizada en el laboratorio. Variaciones diurnas en el contenido de 2-AG fueron descritas en distintas regiones del sistema nervioso de rata. Las actividades de DAGL y MAGL del cuerpo estriado proveniente de ratas sacrificadas en la fase nocturna (10:00 pm) disminuyeron respecto a las determinadas en la fase de luz (10:00 am). En el mismo trabajo se reportó un mayor nivel de 2-AG en el núcleo accumbens, hipocampo, corteza pre frontal y cuerpo estriado durante la fase de luz en relación a la fase de oscuridad (Valenti y col., 2004). Estos resultados apoyarían los nuestros, en cuanto a las variaciones en la actividad de DAGL de los ROS observada por los ciclos estacionales. A partir de estos hallazgos consideramos la primavera y el otoño como las mejores épocas del año para visualizar el efecto lumínico sobre la actividad de la enzima. Otro aspecto interesante radica en que la MAGL, acoplada a DAGL, presenta en su actividad y estímulo lumínico un perfil estacional cuantitativamente diferente al observado para la DAGL, lo que indica un efecto sobre la MAGL, independiente de la disponibilidad del sustrato generado para su actividad.

El análisis general de la actividad de DAGL, independizándonos de su variación estacional, muestra un incremento cuando la retina se estimula por luz. Interesantemente, la luz presenta un efecto dual sobre la actividad y la expresión de

DAGL, ya que mientras la primera se incrementa, el nivel de proteína enzimática decrece. Esto podría interpretarse como una forma de regular la enzima, donde la disminución en la disponibilidad de la proteína podría ayudar a controlar su acción. El efecto observado en la actividad de la DAGL cuando la copa del ojo se expone a la luz (donde podría ocurrir un flujo de proteínas entre el ROS y el RIS), nos llevó a preguntar si este mismo efecto se daba cuando el estímulo lumínico se ejercía sobre el ROS aislado. Los resultados mostraron que el efecto iba en el mismo sentido, lo que indicaría una regulación de la actividad enzimática independiente del movimiento de las proteínas que se ven afectadas por efecto de la luz.

Estudios de Pasquaré y col. (2008) indican una menor actividad de la DAGL acoplada a LPP, en ROS de retinas adaptadas a luz en relación a aquellas mantenidas en oscuridad (Pasquaré y col., 2008). Esto difiere de lo observado en esta Tesis, lo que podría deberse a que el DAG producto de la actividad de la LPP es menor en ROS de retinas adaptadas a luz, por lo tanto, habría una menor disponibilidad de este sustrato para la DAGL en esta condición. Descartamos que estas diferencias se deban a la composición del sustrato debido a que su composición es similar al utilizado en nuestros ensayos. En consecuencia, la actividad de DAGL acoplada a LPP dependería de la actividad de la LPP y del efecto de la luz sobre esta enzima. En cambio, en el presente trabajo la actividad de DAGL, ensayada empleando un DAG exógeno, no se ve afectada por la disponibilidad de un sustrato generado por otra enzima.

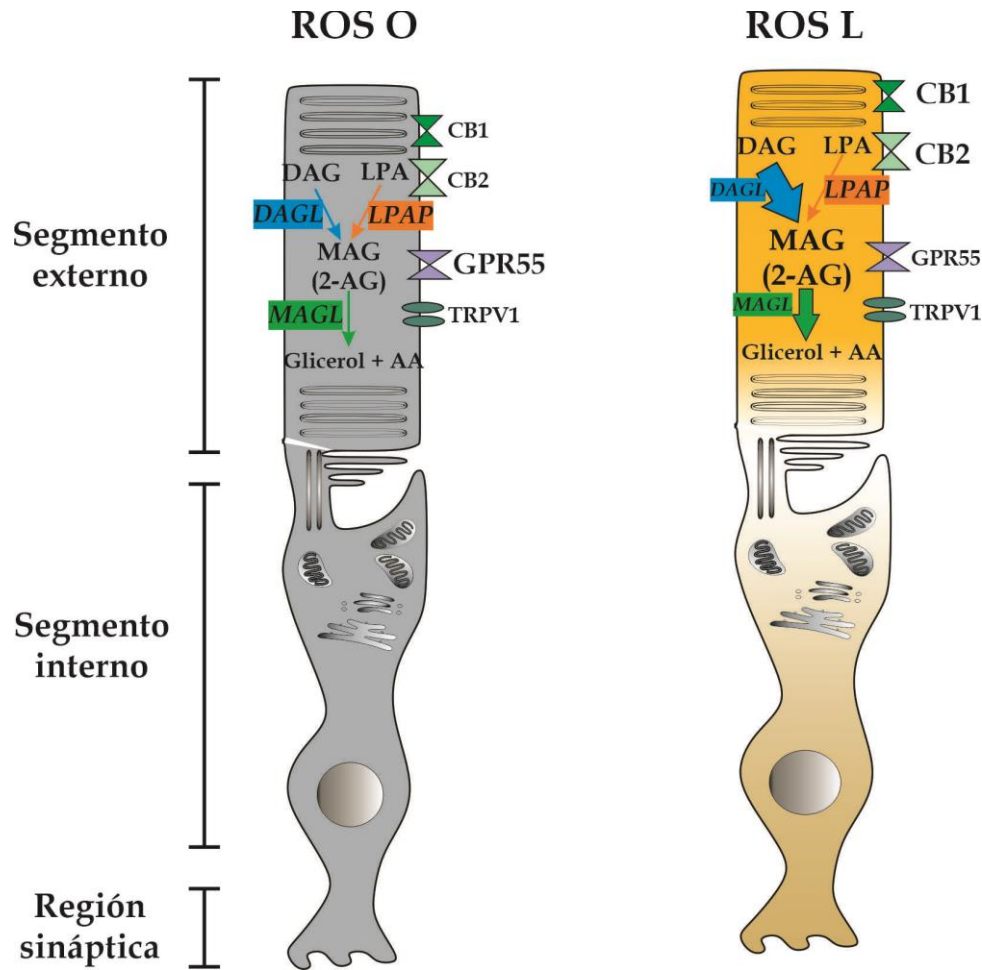
Los resultados del efecto de la luz sobre la actividad de DAGL, estarían indicando una activa participación de su producto (2-AG) en el procesamiento de la señal lumínica en los ROS. La DAGL está involucrada en la fototransducción de *Drosophila* (Leung y col., 2008, Minke y Parnas, 2006, Huang y col., 2004). En esta especie este proceso ocurre en una estructura del fotorreceptor llamada rabdómero. Aquí, el estímulo de la rodopsina (acoplada a proteína Gq) por luz desencadena la activación de una PLC que hidroliza a PIP₂, generando DAG e IP₃, lo que facilita la apertura de los canales dependientes de luz, el TRP y el TRPL (TRP-Like) (Minke y Parnas, 2006). Una mutación en el gen *inaE* que codifica para DAGL de *Drosophila*, fue identificada en moscas que presentaban una respuesta defectuosa a la luz. Estos estudios demostraron que la acción de la DAGL es necesaria para la generación de la respuesta del fotorreceptor a la luz y que, si bien el DAG no tiene un rol directo en la activación de los canales, el producto generado por la DAGL o la enzima misma podrían ser responsables de la respuesta lumínica (Leung y col., 2008).

Otra de las vías involucradas en la síntesis del 2-AG es por acción de la LPAP sobre el LPA. La actividad de LPAP en ROS O presentó ligeras diferencias para cada set de experimentos, en consecuencia las actividades de la enzima en ROS L y ROS B fueron comparadas contra sus respectivos controles en oscuridad. Bajo las mismas condiciones de iluminación que para la DAGL, la actividad de LPAP no se vio modificada, ya que su actividad en ROS L y ROS B no presentó diferencias respecto a ROS mantenidos en oscuridad (ROS O).

La hidrólisis del 2-AG fue analizada determinando la actividad de MAGL, la principal enzima de degradación de este endocannabinoide (Dinh y col., 2004). Para esto se empleó un MAG conteniendo entre otros ácidos grasos un 11 % de ácido araquidónico. La actividad de esta enzima en ROS fue observada no solo usando sustrato exógeno, sino también sobre el MAG producto de la actividad de la DAGL. La producción de glicerol en el último caso fue tres veces mayor que al emplear el sustrato exógeno, lo que sugiere que la DAGL y la MAGL formarían un complejo enzimático donde el producto de la primera enzima estaría más accesible al sitio activo de la segunda enzima y/o que la unión de la enzima a la bicapa lipídica sería una cuestión crucial en la actividad de la MAGL como fue demostrado para otras enzimas del metabolismo lipídico (Pagano y Longmuir, 1985). Interesantemente, el efecto del estímulo lumínico fue solo observado cuando la actividad se determina usando el sustrato exógeno. La formación de glicerol por la acción de DAGL/MAGL mostró un incremento en ROS L aparente pues este es consecuencia del estímulo ejercido bajo esta condición sobre la actividad de DAGL, lo que genera una mayor disponibilidad del sustrato (MAG) para la MAGL. De acuerdo con esto, el mismo porcentaje de formación de MAG (65 %) y de glicerol (35 %) fue observado en ROS O y ROS L. Sin embargo, la alta disponibilidad de MAG sin cambios en la actividad de MAGL puede significar que la enzima esté saturada a esta concentración de sustrato (Savinainen y col., 2014, Gaveglio, 2012). Esto puede ser posible porque la concentración de MAG generado por hidrólisis de DAG fue equivalente a 11 μM en ROS O (concentración similar a la del

sustrato exógeno empleado en ROS O y ROS L), mientras en ROS L fue de 24 μ M. Por lo tanto, se puede concluir que, aunque la síntesis e hidrólisis del 2-AG son estimuladas en ROS L, el efecto sobre la enzima encargada de la síntesis de 2-AG es significativamente mayor, lo que estaría indicando una mayor disponibilidad de este endocannabinoide en ROS cuando la retina está sometida a luz. Es interesante destacar que la actividad de la MAGL no se modificó cuando el estímulo de la luz se ejerció sobre el ROS aislado (ROS B), a diferencia de lo observado por acción de la luz sobre la retina (ROS L), lo que sugiere que esta enzima podría estar regulada por alguna proteína que migraría por efecto de la luz entre el RIS y el ROS, como es el caso de la arrestina (Kerov y col., 2005, Strissel y col., 2005, Sokolov y col., 2002).

Considerando lo observado en este trabajo en lo que respecta al contenido de proteínas y a la actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo del 2-AG, además del estímulo ejercido por la luz sobre la actividad enzimática de PLC descrito por Ghalayini y Anderson (1992), podemos inferir que bajo condiciones de luz sería necesaria una mayor disponibilidad de 2-AG (Esquema 15).

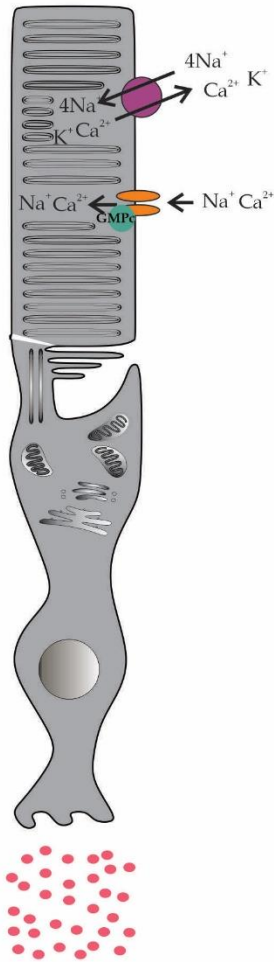


Esquema 15. El sistema endocannabinoide y su modulación por estímulo de luz en el segmento externo de los bastones (ROS). Se esquematiza la expresión y las actividades de las enzimas de síntesis (DAGL y LPAP) e hidrólisis (MAGL) del 2-AG, y el nivel de receptores que responden a cannabinoides. Las enzimas están representadas por distintos colores, el tamaño de los recuadros y el grosor de las flechas indican el nivel proteico y de actividad de dichas enzimas, respectivamente. El tamaño en los nombres de MAG (2-AG), CB1, CB2, GPR55 y TRPV1 representa su predominio en ROS provenientes de retinas adaptadas a la oscuridad (ROS O) o expuestas a luz (ROS L).

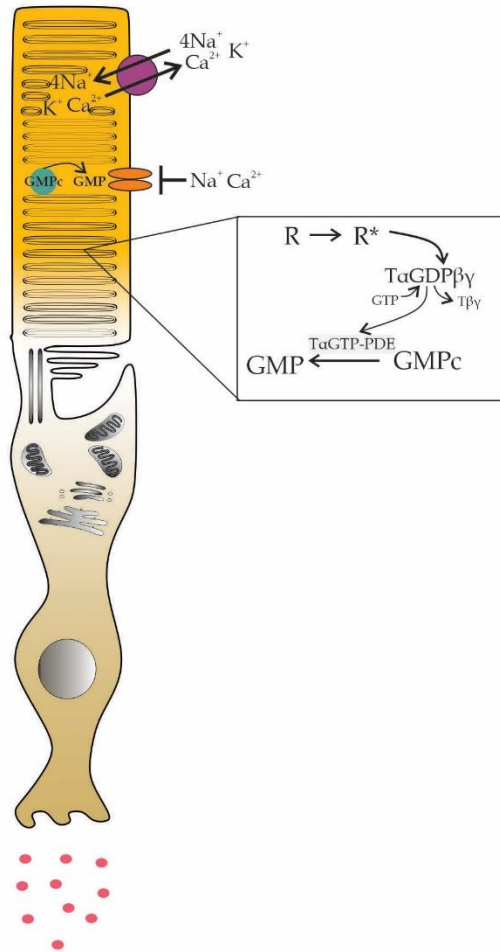
Tsumura y col. (2012) encontraron en un tipo celular no excitable, odontoblastos (células generadoras de dentina), que el 2-AG incrementa la concentración intracelular de Ca^{2+} , efecto que fue inhibido antagonizando los receptores CB1 y TRPV1 (Tsumura

y col., 2012). Estos autores concluyeron que en estas células el TRPV1 media la entrada de Ca^{2+} acoplándose funcionalmente al receptor CB1 por la activación de la vía de señalización del AMPc. Además observaron que el Ca^{2+} intracelular es extraído por el intercambiador de Na^+ - Ca^{2+} . Los hallazgos de Tsumara y col. (2012) enunciados nos permiten hipotetizar que el incremento que genera la luz en la disponibilidad del 2-AG acompañado de la mayor expresión de receptores cannabinoides en los ROS estaría generando una mayor señalización vía estos receptores y/o un acople funcional con TRPV1 produciéndose a través de este una entrada de Ca^{2+} al ROS, lo que contribuiría en la regulación de la corriente de iones, modificados en la respuesta a la luz (Esquema 16 C). Por otro lado, la entrada de Ca^{2+} a los ROS es a través de los canales CNG y su salida por intercambiadores de Na^+ - Ca^{2+} , pudiendo participar el TRPV1 en la homeostasis de Ca^{2+} . Si bien describimos la presencia del TRPV1 en ROS y observamos que no se modifica por luz, estudios adicionales son necesarios para establecer de manera certera su funcionalidad en ROS y en el proceso visual.

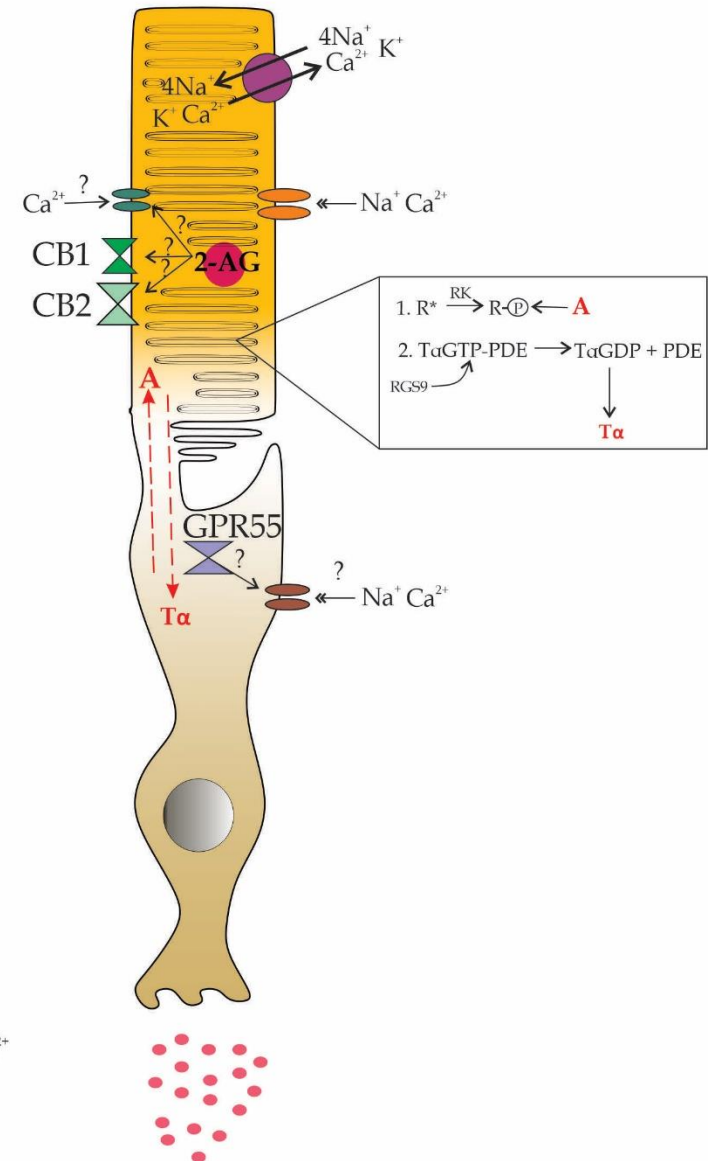
A ROS en oscuridad



B Respuesta de los ROS a la luz



C ROS adaptados a luz



- NCKX1
- GMPc
- TRPV1
- CB2
- Canales de Na⁺ Ca²⁺
- CNG
- Glutamato
- CB1
- GPR55
- 2-AG

Esquema 16. Representación de la posible función del SEC en el bastón. En la condición de oscuridad los canales CNG (gatillados por nucleótidos cíclicos) permanecen abiertos permitiendo el ingreso de iones Na^+ y Ca^{2+} a la célula debido a la presencia de GMPc, esto genera una despolarización parcial que favorece la liberación de glutamato (A). La luz desencadena una cascada de señalización denominada proceso de fototransducción. En los bastones, la rodopsina (R) detecta la luz y sufre un cambio conformacional en su cromóforo (R^*), favoreciendo la disociación de la subunidad alfa de la transducina de su estado heterotrimérico ($\text{T}\alpha\text{GDP}\beta\gamma$). La subunidad alfa ($\text{T}\alpha\text{GTP}$) activa la fosfodiesterasa (PDE) generando la hidrólisis del GMPc. La disminución en los niveles de GMPc produce el cierre de los canales CNG, ocasionando la disminución en la liberación de glutamato (B). En presencia de luz brillante continua, el fotorreceptor tiene una maquinaria de adaptación a la luz que involucra la regulación de los niveles de GMPc y Ca^{2+} . La desactivación de la PDE es acelerada por la hidrólisis de GTP de la $\text{T}\alpha\text{GTP}$ generado por el RGS9 y por la fosforilación de la R^* por la rodopsina quinasa (RK) y posterior unión de la arrestina (A). La extracción continua de iones de Ca^{2+} por el intercambiador NCKX1 ocasiona una disminución en los niveles de este ión intracelular, produciendo la activación de la guanilil ciclasa, incrementando los niveles de GMPc y ocasionando la apertura de los canales CNG. Por otro lado, el incremento del 2-araquidonoilglicerol (2-AG) y de los receptores CB1 y CB2 en el segmento externo podrían estar participando en la adaptación a la luz. Interesantemente, el TRPV1 es un canal de Ca^{2+} que podría estar involucrado en la recuperación de los niveles de Ca^{2+} intracelular, además el GPR55 podría estar migrando al segmento interno y generando la apertura de canales de Na^+ y Ca^{2+} por lo tanto, favoreciendo la liberación de glutamato (C). Las flechas rojas indican el movimiento de la A y de la subunidad alfa de la transducina ($\text{T}\alpha$) en el bastón cuando la copa de ojo es expuesta a 3000 luxes por 30 minutos.

CAPÍTULO II

**ESTUDIO DE LA MODULACIÓN DEL METABOLISMO
DEL 2-ARAQUIDONOILGLICEROL**

RESULTADOS**A) EFECTO DE LAS PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN EL PROCESO DE FOTOTRANSDUCCIÓN****1. Acción de moduladores de la actividad de proteínas G en la regulación del metabolismo del 2-araquidonoilglicerol****1.1 Actividad de las enzimas de síntesis del 2-araquidonoilglicerol, diacilglicerol lipasa y lisofosfatidato fosfohidrolasa, en los ROS incubados en presencia de análogos de los nucleótidos de guanina: GTP γ S y GDP β S**

Los ROS O fueron preincubados durante 15 minutos con GTP γ S o GDP β S en luz roja y a temperatura ambiente; luego parte de los mismos fueron sometidos a 3000 luxes por 30 min (ROS B). Seguido de esto se ensayó la actividad de cada una de las enzimas de síntesis en ambas preparaciones de ROS (ROS O y ROS B).

La actividad de la DAGL incrementó un 89 % en ROS O preincubados con GTP γ S respecto a la actividad en ausencia del análogo (Fig. 13 A). Es interesante señalar que la actividad enzimática observada en ROS O, por efecto del análogo, es similar a la observada en ROS B. Por otro lado, los nucleótidos no modificaron la actividad de la enzima en ROS B (Fig. 13 C), como tampoco la actividad de MAGL acoplada a esta, en ninguna de las condiciones evaluadas (Fig. 13 B y D).

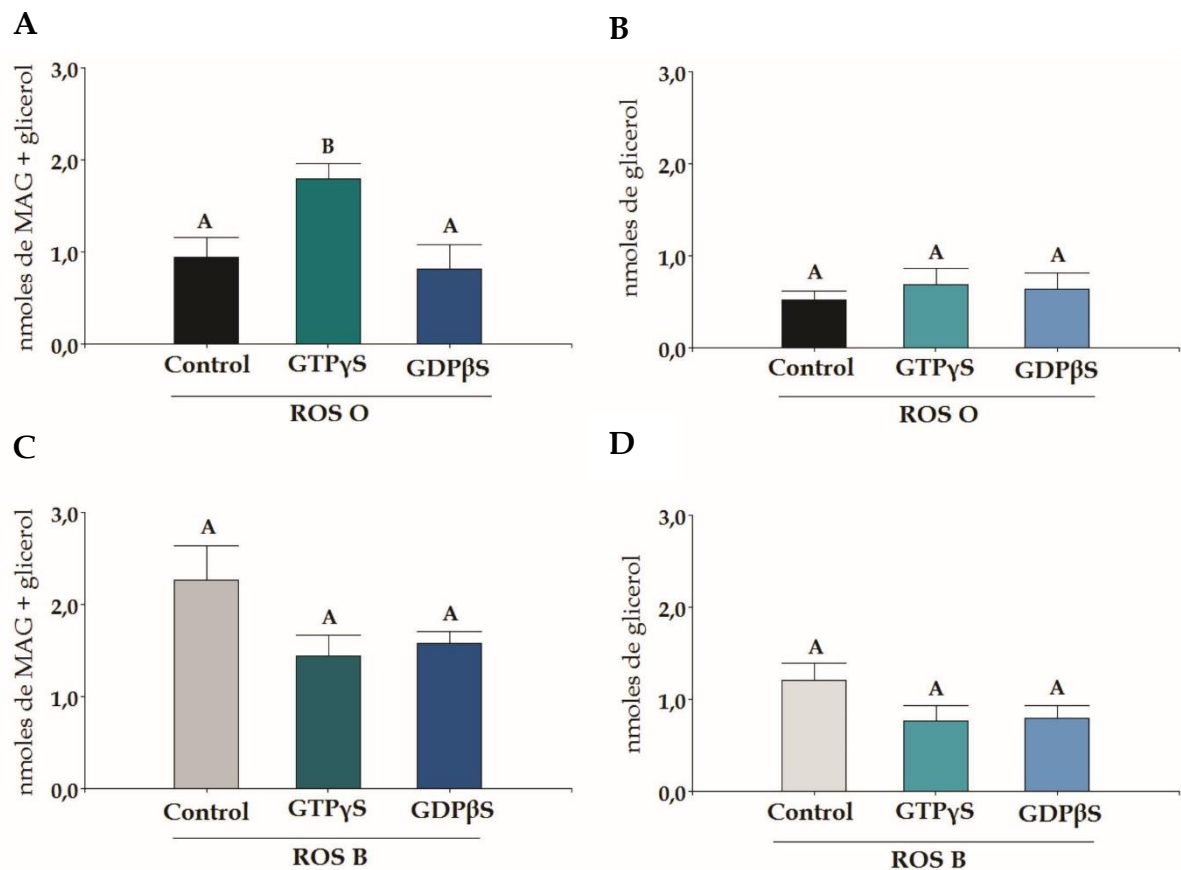


Figura 13. Actividad de la DAGL en los ROS incubados con GTPγS y GDPβS. La actividad enzimática fue ensayada en ROS obtenidos en oscuridad (2,3 mg de proteínas/320 μl de *buffer* A libre de sacarosa) preincubados bajo luz roja durante 15 minutos con GTPγS o GDPβS a una concentración final de 1 mM para ambos nucleótidos. Finalizada la preincubación, los ROS se mantuvieron en oscuridad (ROS O) (A) o fueron expuestos a 3000 luxes por 30 minutos a temperatura ambiente (ROS B) (C). Después de este tiempo se ensayó la actividad de DAGL como se especifica en la Fig. 7. La actividad de MAGL acoplada a DAGL bajo las condiciones ensayadas se muestra en los gráficos B y D. Los datos fueron analizados empleando el análisis de varianza no paramétrico *Kruskal Wallis* ($N = 3, n \geq 6$). Los resultados representan la media y el error estándar. Las letras diferentes representan diferencias significativas con un $p < 0,05$.

La actividad de la LPAP no presentó diferencias significativas en las condiciones evaluadas (Fig. 14 A). Sin embargo, es de destacar que en ROS B el GDPβS inhibió (71 %) la formación de oleato comparado con su producción sin el agregado de nucleótido (Fig. 14 B).

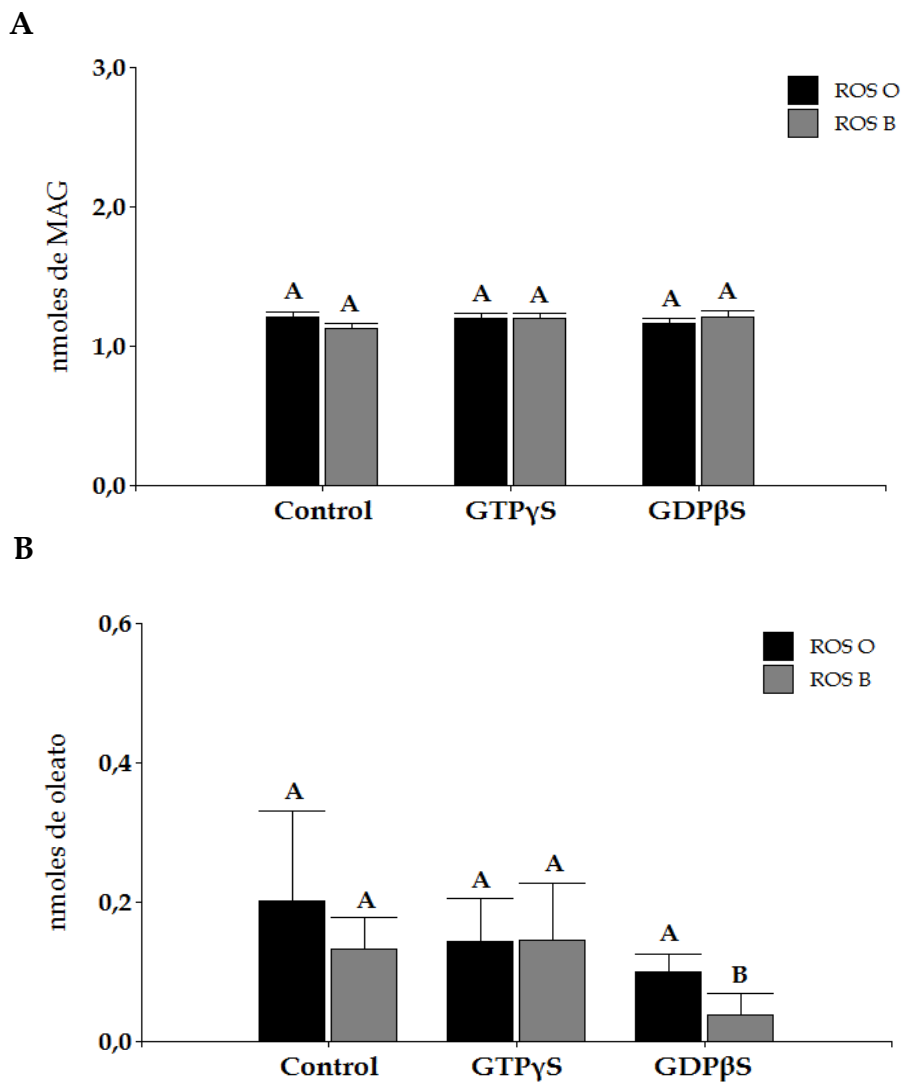


Figura 14. Actividad de la LPAP en los ROS incubados con GTP γ S y GDP β S. La actividad enzimática fue ensayada en ROS obtenidos en oscuridad (2,3 mg de proteínas/320 μ l de *buffer A* libre de sacarosa) preincubados bajo luz roja durante 15 minutos con GTP γ S o GDP β S a una concentración final de 1 mM para ambos nucleótidos. Finalizada la preincubación, los ROS se mantuvieron en oscuridad (ROS O) o fueron expuestos a 3000 luxes por 30 minutos a temperatura ambiente (ROS B). Después de este tiempo se ensayó la actividad de la LPAP como se especifica en la Fig. 10. Las gráficas muestran la producción de MAG (A) y de oleato (B). (A) Los datos fueron analizados utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, con un post test de LSD Fisher para cada una de las condiciones ensayadas. Los resultados representan la media y el error estándar ($N = 3, n = 9$). (B) Los datos fueron analizados empleando el análisis de varianza no paramétrico (*Kruskal Wallis*). Los resultados representan la media y el error estándar ($N = 3, n = 9$). Las letras diferentes representan diferencias significativas con un $p < 0,05$.

1.2 Actividad de la enzima de hidrólisis del 2-araquidonoilglicerol, monoacilglicerol lipasa, en los ROS incubados en presencia de los análogos de nucleótidos de guanina: GTP γ S y GDP β S

La actividad de la MAGL fue ensayada en ROS O y ROS B previamente tratados con los análogos como se especifica en 1.1 de este Capítulo. La actividad de esta enzima no presentó diferencias significativas en las condiciones evaluadas (Fig. 15).

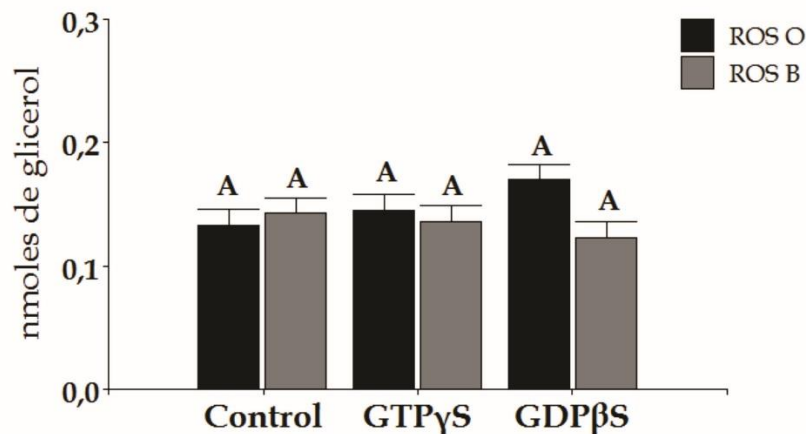


Figura 15. Actividad de la MAGL en los ROS incubados con GTP γ S y GDP β S. La actividad enzimática fue ensayada en ROS obtenidos en oscuridad (2,3 mg de proteínas/320 μ l de *buffer* A libre de sacarosa) preincubados bajo luz roja durante 15 minutos con GTP γ S o GDP β S a una concentración final de 1 mM para ambos nucleótidos. Finalizada la preincubación, los ROS se mantuvieron en oscuridad (ROS O) o fueron expuestos a 3000 luxes por 30 minutos a temperatura ambiente (ROS B). El ensayo se realizó como se especifica en la Fig. 12 A. Los datos fueron analizados utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, con un post test de LSD Fisher para cada una de las condiciones ensayadas. Los resultados representan la media y el error estándar ($N = 3$, $n = 9$). Las letras similares indican que no hay diferencias significativas en las condiciones evaluadas.

2. Efecto de las proteínas que se asocian a la membrana del ROS en la regulación del metabolismo del 2-araquidonoilglicerol

2.1 Análisis electroforético de las proteínas de ROS O y ROS B tratados con *buffers* de diferente fuerza iónica

Se evaluó la extracción selectiva de algunas proteínas involucradas en el proceso de fototransducción con el propósito de ver si la presencia o ausencia de alguna de ellas en particular modulaba la actividad de las enzimas responsables del metabolismo del 2-AG. Para esto los ROS fueron tratados con *buffers* de diferente fuerza iónica (baja y moderada). El nivel de las proteínas en cada tratamiento fue evaluado en la fracción de membrana y en la fracción soluble (Fig. 16). Las proteínas identificadas, comprometidas en el proceso de fototransducción, fueron la fosfodiesterasa (PDE), la rodopsina quinasa (RK), la arrestina y la subunidad alfa de la transducina ($T\alpha$).

El soluble, proveniente de ROS O tratados con *buffer* Tris 5 mM (baja fuerza iónica), mostró la presencia de las proteínas PDE, RK, arrestina y $T\alpha$; mientras que, en la misma fracción, originada por el tratamiento de ROS O con *buffer* Tris 100 mM (moderada fuerza iónica), se observaron principalmente la RK y la arrestina (Fig. 16 A y B). El soluble resultante del tratamiento de los ROS B (ROS O sometidos a 3000 luxes durante 30 minutos) con los *buffers* de diferente fuerza iónica mostraron las proteínas PDE, RK y arrestina (Tris 5 mM), y RK y arrestina (Tris 100 mM) (Fig. 16 C y D). La fracción de membrana de los respectivos tratamientos muestra la ausencia parcial o total de estas proteínas (Fig. 16 A y C)

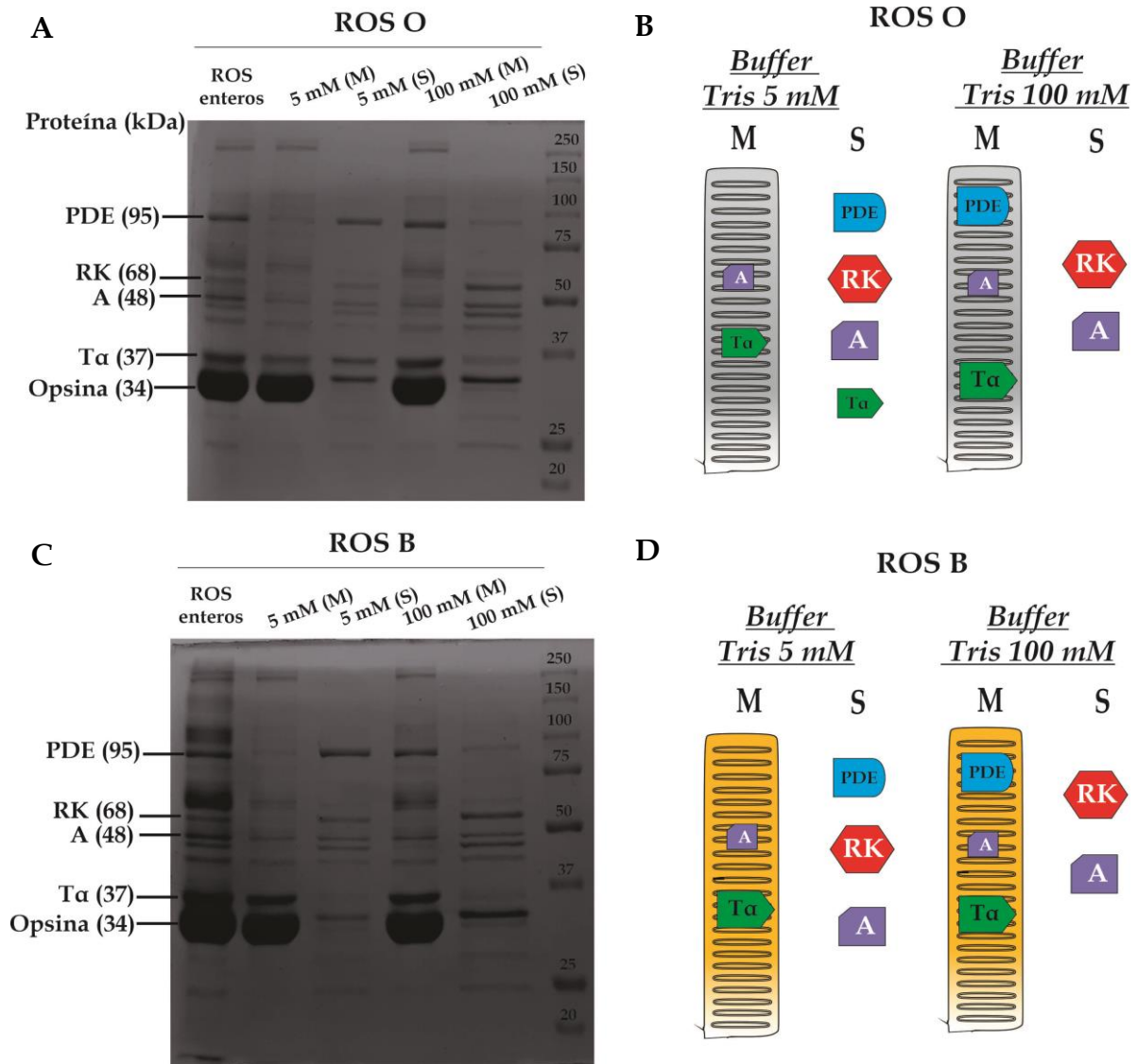


Figura 16. Distribución proteica en ROS O y ROS B tratados con buffers de diferente fuerza iónica. Los ROS fueron resuspendidos con buffers de distinta fuerza iónica y mantenidos en oscuridad (ROS O) (4°C) o expuestos a 3000 luxes por 30 minutos a temperatura ambiente (ROS B), y posteriormente separada la fracción de membrana del soluble, como se detalla en la sección 6.2 de Materiales y Métodos. Los paneles A y C muestran las corridas electroforéticas de las proteínas de la membrana (M) y del soluble (S) de los ROS O (A) y ROS B (C) tratados con buffer Tris-HCl 5 mM pH 7,4 (5 mM) y buffer Tris-HCl 100 mM pH 7,4 (100 mM). Para la resolución de las proteínas se sembraron 35 μ g de los ROS enteros y de la fracción de membrana, y 10 μ g de proteína del soluble. Los números a la derecha en los gels indican los pesos moleculares en kDa correspondientes a un estándar de proteínas. Las proteínas identificadas fueron fosfodiesterasa (PDE), rodopsina quinasa (RK), arrestina (A), la subunidad alfa de la transducina (T α) y la opsina, los números entre paréntesis observados a la izquierda indican el peso molecular de cada una de ellas. Los gráficos (B y D) representan la distribución de proteínas de la membrana y del soluble de los ROS O (B) y ROS B (D) luego de los tratamientos con los distintos buffers mostrado en los gels de los paneles A y C.

2.2 Actividad de la diacilglicerol lipasa y monoacilglicerol lipasa en ROS O y ROS B tratados con *buffers* de diferente fuerza iónica

Dado que las actividades de la DAGL y la MAGL fueron modificadas por estímulo lumínico es que se decidió evaluar si alguna de las proteínas del proceso de fototransducción estaban involucradas en la modulación de estas enzimas, empleando como herramienta experimental los tratamientos a los ROS con *buffers* de diferente fuerza iónica.

2.2.1 Actividad de la diacilglicerol lipasa en ROS O y ROS B tratados con *buffers* de diferente fuerza iónica

Los resultados sobre la actividad de DAGL no son presentados en esta instancia porque no fue posible ensayarla, debido a la baja actividad presentada en los ROS O y a la ausencia de estímulo lumínico. Se observó que la actividad en ROS O obtenidos en noviembre (primavera) disminuyó un 59 % comparado con preparaciones de ROS obtenidos en mayo (otoño) (Fig. 17 A). De hecho, el MAG formado fue totalmente hidrolizado a glicerol, observándose solamente este último producto (Fig. 17 A inserto). Para establecer si la baja actividad observable en esta época se debía a la ausencia de la enzima, se determinó su expresión (DAGL α) en preparaciones de ROS obtenidos en abril (otoño) y noviembre (primavera), observándose una disminución (49 %) de la misma en ROS obtenidos en noviembre (primavera) respecto a preparaciones de ROS obtenidos en abril (otoño) (Fig. 17 B).

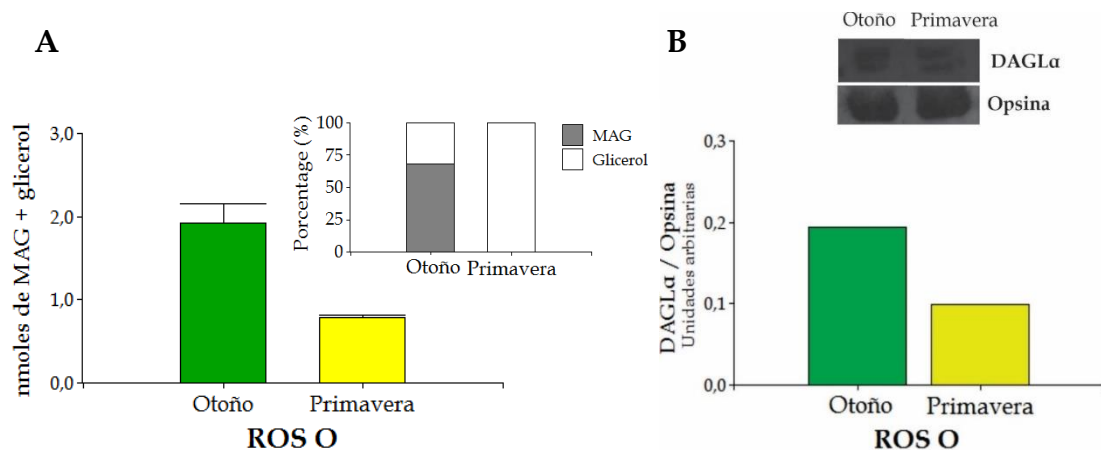


Figura 17. Actividad y expresión de la DAGL en preparaciones de ROS obtenidos en otoño (abril-mayo) y primavera (noviembre) mantenidos en oscuridad (ROS O). La actividad enzimática se ensayó empleando 150 μ g de proteína y en las condiciones que se especifican en la leyenda de la Fig. 8. El gráfico inserto a la derecha de la figura A indica la distribución porcentual del producto de la actividad de la DAGL de los ROS obtenidos en otoño (mayo) y en primavera (noviembre) (A). El nivel de DAGL α fue medido en preparaciones de ROS obtenidos en otoño (abril) y en primavera (noviembre). Esta enzima fue detectada mediante la técnica de WB con un anticuerpo específico como se detalla en la Tabla 1 (Sección 2 de Materiales y Métodos). El gráfico de barras muestra la densidad relativa correspondiente al nivel de proteína en relación con el control de carga (opsina). La opsina fue visualizada por tinción de la membrana con *Commasie Blue* (B).

2.2.2 Actividad de la monoacilglicerol lipasa en ROS O y ROS B tratados con buffers de diferente fuerza iónica

La actividad de MAGL fue ensayada en membranas de ROS O y ROS B previamente tratadas con *buffer* de distinta fuerza iónica, estos tratamientos están descritos en la sección 6.2 de Materiales y Métodos. La actividad de esta enzima disminuyó 27 % y 18 % en membranas de ROS O y ROS B tratados con *buffer* Tris 5 mM respecto a ROS O y ROS B enteros (ROS no tratados), respectivamente (Fig. 18). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la actividad de MAGL entre ROS O y ROS B a la fuerza iónica de 5 mM. La actividad de MAGL de ROS O y ROS B no se vió afectada por el tratamiento a 100 mM (Fig. 18).

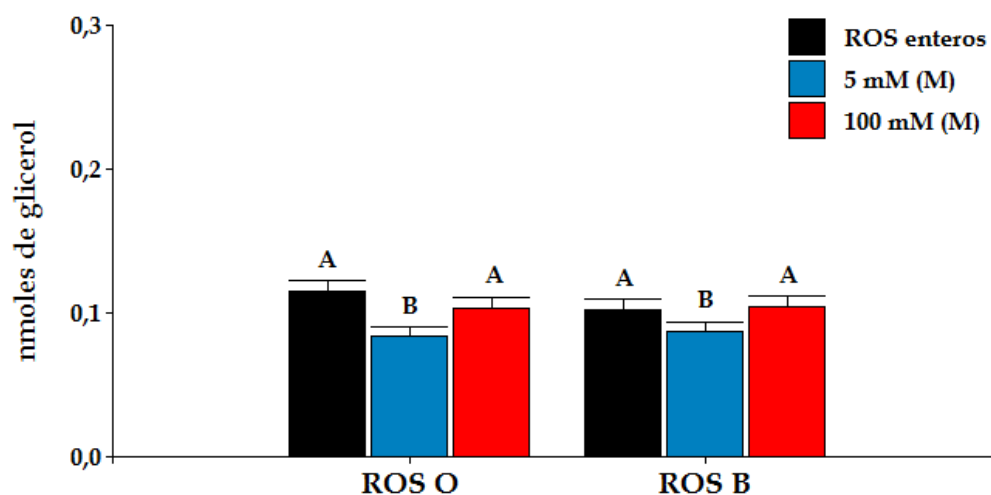


Figura 18. Actividad de la MAGL en ROS enteros o tratados con buffers de distinta fuerza iónica. La actividad enzimática fue ensayada en la fracción de membrana (M) proveniente de ROS mantenidos en oscuridad a 4°C (ROS O) ó ROS expuestos a 3000 luxes por 30 minutos (ROS B) y tratados con *buffer* Tris-HCl 5 mM pH 7,4 (5 mM) ó *buffer* Tris-HCl 100 mM pH 7,4 (100 mM) como se detalla en la Sección 6.2 de Materiales y Métodos. El ensayo se realizó empleando 100 µg de proteína de la fracción de membrana de ROS o de ROS enteros como se especifica en la leyenda de la Fig. 12 A. Los datos fueron analizados utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, con un post test de LSD Fisher para cada una de las condiciones ensayadas. Los resultados representan la media y el error estándar, de tres tubos tratados independientemente con los distintos *buffers*, con tres mediciones de la actividad de la enzima por cada condición ($N = 3$, $n = 9$). Las letras diferentes indican diferencias significativas en las condiciones evaluadas con un $p < 0,05$.

La MAGL es una enzima que se encuentra en el citosol y/o asociada periféricamente a la membrana (Blankman y col., 2007, Dinh y col., 2004). Con el propósito de establecer si la disminución en la actividad de MAGL era consecuencia de su posible extracción desde la membrana por los tratamientos a diferente fuerza iónica es que se evaluó la expresión de la enzima en la membrana y en los solubles después de los respectivos tratamientos. Los resultados muestran que el tratamiento con Tris 100 mM sobre ROS O y ROS B extrae la enzima de la membrana, observándose menor presencia de esta en la fracción de membrana (Fig. 19 A) lo que condice con su mayor expresión en la fracción soluble (Fig. 19 B). Se puede observar que la

mayor extracción de la enzima ocurre en el estado iluminado del ROS. Por otra parte, el Tris 5 mM logra la extracción parcial de la enzima desde la membrana sólo en ROS B (Fig. 19 A y B).

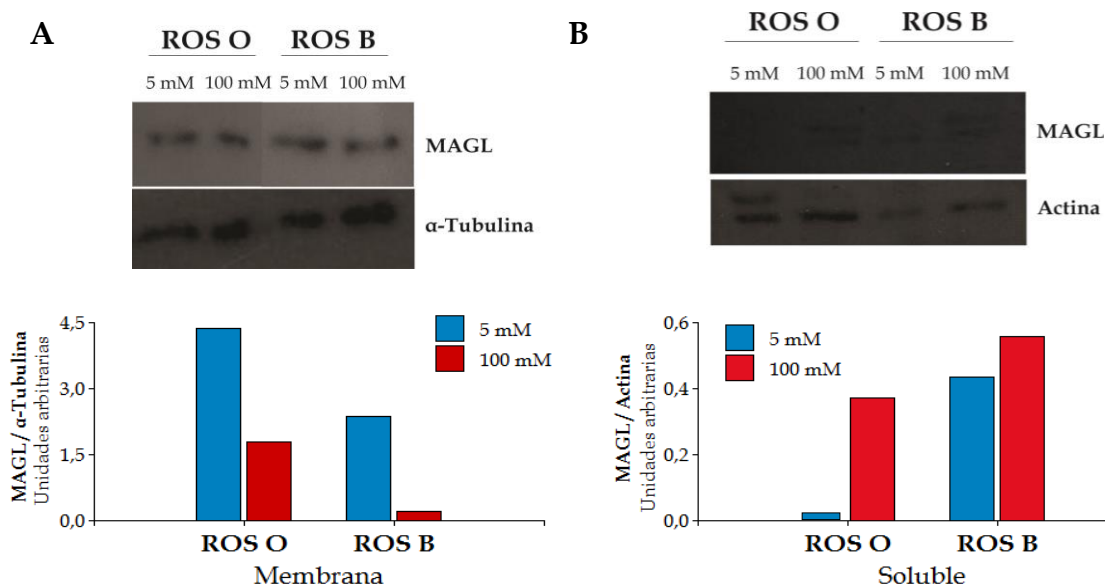


Figura 19. Expresión de la MAGL en la fracción de membrana y en el soluble de los ROS tratados con buffer de distinta fuerza iónica. El nivel proteico de la MAGL fue medido en la membrana (30 μ g de proteína) (A) y soluble (10 μ g de proteína) (B) de los ROS O y ROS B tratados con buffer Tris 5 mM y 100 mM pH 7,4 como se indica en la Sección 6.2 de Materiales y Métodos. Los anticuerpos empleados se detallan en la Tabla 1 (Sección 2 de Materiales y Métodos). Los gráficos de barras muestran la densidad relativa correspondiente al nivel de proteína de la MAGL en relación con el control de carga (α -tubulina o actina).

B) EFECTO DE AGONISTAS Y ANTAGONISTAS DE RECEPTORES CANNABINOIDES

1. Acción de agonistas y antagonistas de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 sobre el metabolismo del 2-araquidonoilglicerol

Las actividades de síntesis e hidrólisis del 2-AG fueron ensayadas en ROS O y ROS B, previamente tratados con: WIN, agonista de los receptores CB1 y CB2, JWH,

agonista específico del receptor CB2, antagonistas de los receptores CB1 (SR1) y CB2 (SR2) como se indica en la sección 7.1 de Materiales y Métodos.

1.1 Efecto de agonistas y antagonistas de receptores cannabinoides sobre las actividades de las enzimas de síntesis del 2-araquidonoilglicerol

Resultados sobre la actividad de la DAGL no son presentados en esta instancia pues no fue posible ensayarla debido a la baja actividad presentada en los ROS, por la época del año en que estos fueron obtenidos (noviembre, primavera) como se explica en Resultados, Capítulo II sección A 2.2.1. Por lo tanto, solamente fue evaluada la acción de los agonistas y antagonistas sobre la actividad de la LPAP.

La actividad de la LPAP disminuyó 32 % en ROS O preincubados con WIN o JWH en relación a ROS O control. Una disminución mucho más marcada en la actividad de la enzima por acción de los agonistas fue observada en ROS B, donde cada uno de los agonistas generó una disminución del 60 % respecto al control de ROS B (Fig. 20 A).

En las condiciones de ensayo para LPAP, también se observó la formación de oleato (Fig. 20 B). El WIN anula su producción en ROS O y ROS B. Además, el JWH incrementó la formación de oleato (120 %) en ROS O (Fig. 20 B).

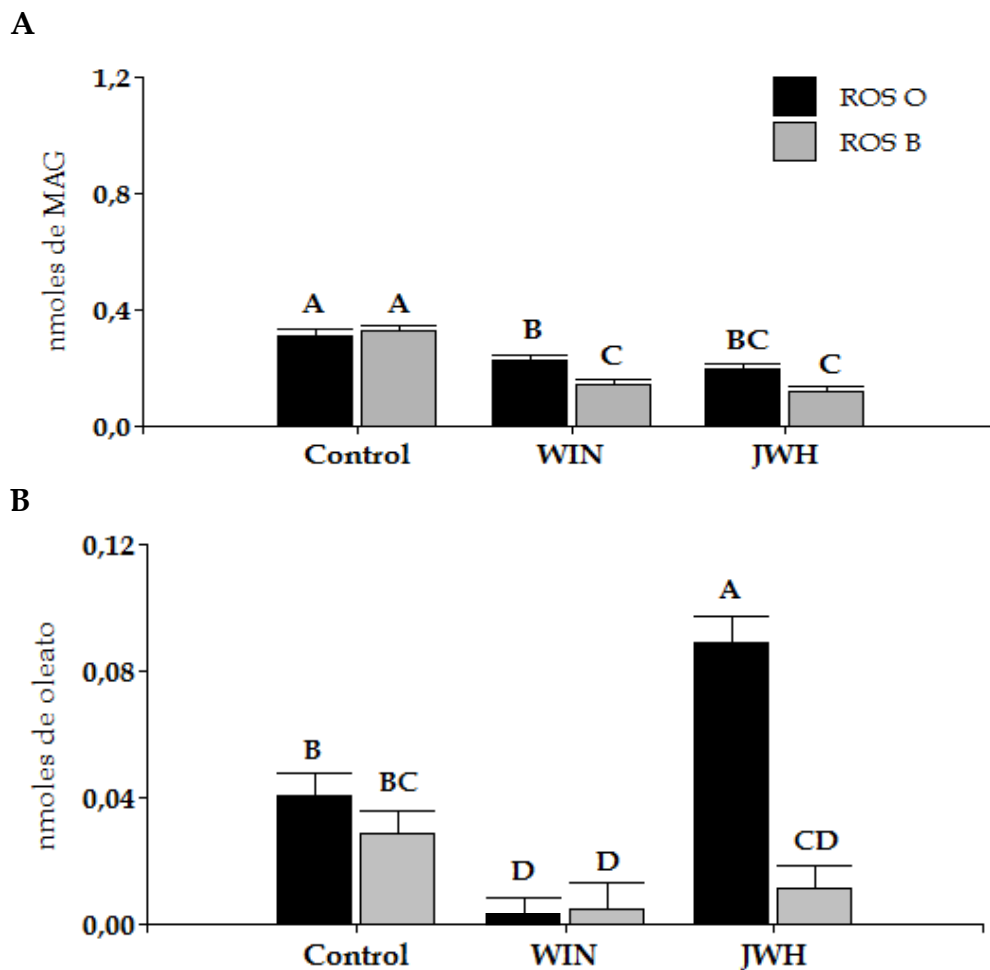


Figura 20. Actividad de la LPAP en ROS O y ROS B preincubados con los agonistas de los receptores cannabinoides. ROS O y ROS B (100 μ g de proteína) fueron preincubados con el agonista de los receptores CB1 y CB2 (WIN55212-2, WIN) o el agonista del receptor CB2 (JWH-133, JWH) en presencia de NEM 4,4 mM en el mismo *buffer* de ensayo por 10 minutos. Después de este tiempo se llevó adelante el ensayo enzimático como se indica en la Fig. 10, empleándose en este caso 2500 dpm de 1-[9,10- 3 H]oleoil-LPA. Los controles fueron ensayados en presencia y ausencia de DMSO al 0,2 % en el volumen final del ensayo. Los datos fueron analizados utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, con un post test de LSD Fisher para cada una de las condiciones ensayadas. Los resultados representan la media y el error estándar de un experimento con cinco mediciones. Las letras diferentes representan diferencias significativas con un $p < 0,05$.

Respecto a los antagonistas, la actividad de la LPAP disminuyó un 71 % y 51 % en ROS O preincubados con SR1 ó SR2 comparada a la observada en ROS O control, respectivamente. Cada uno de los antagonistas disminuyó la actividad de esta enzima en un 48 % en ROS B respecto a ROS B control (Fig. 21 A). Por otro lado, la

actividad de la LPAP en los ROS O preincubados con ambos antagonistas juntos fue similar a los ROS O en presencia del SR1 y un 22 % menor a los preincubados con SR2. La actividad de LPAP en ROS B preincubados conjuntamente con ambos antagonistas, fue similar a la observada en presencia de cada uno de los antagonistas individualmente.

Por otra parte, la formación de oleato no fue modificada por la adición de los antagonistas en ninguna de las condiciones evaluadas (Fig. 21 B).

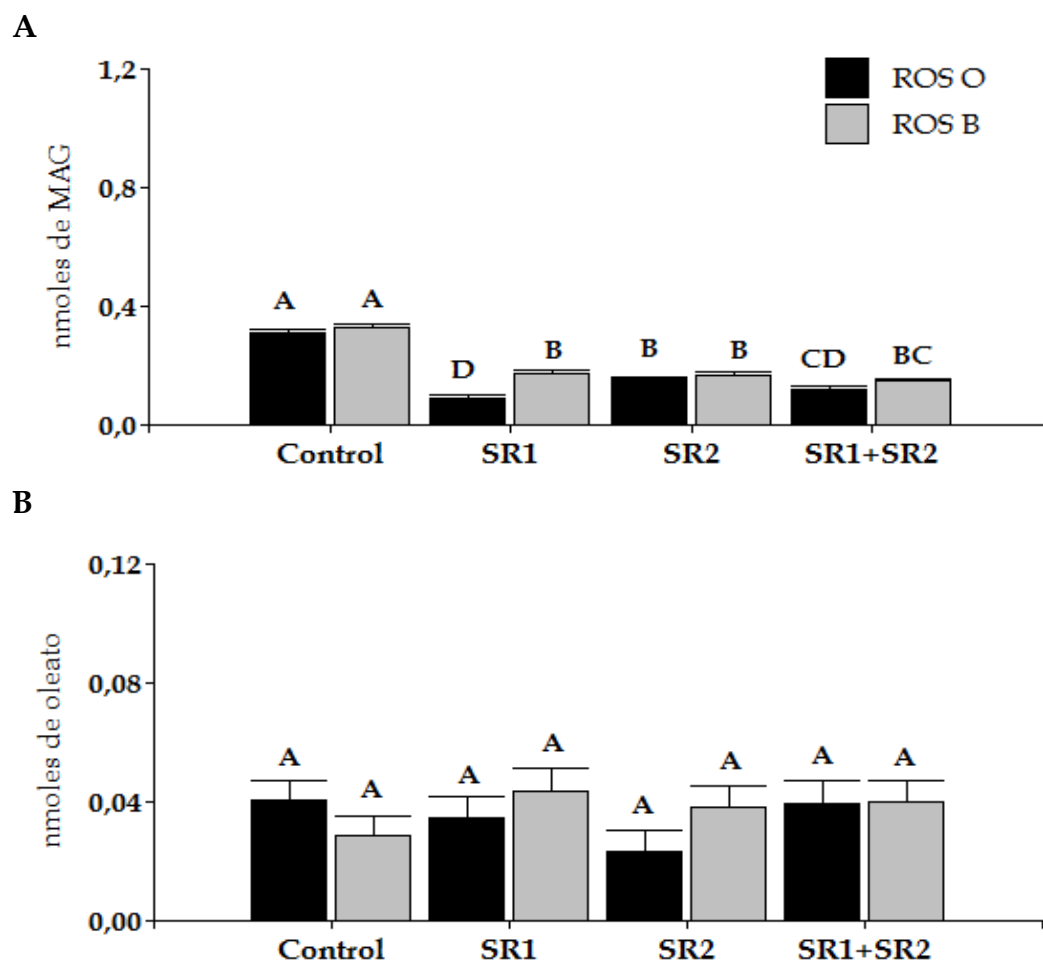


Figura 21. Actividad de la LPAP en ROS O y ROS B preincubados con los antagonistas de los receptores cannabinoides. ROS O y ROS B (100 μ g de proteína) fueron preincubados con el antagonista del receptor CB1 (SR141716, SR1) o del receptor CB2 (SR144528, SR2), o

de ambos en presencia de NEM 4,4 mM en el mismo *buffer* de ensayo por 10 minutos. Después de este tiempo se llevó adelante el ensayo enzimático como se indica en la Fig. 10, empleándose en este caso 2500 dpm de 1-[9,10-³H]oleoil-LPA. Los controles fueron ensayados en presencia de DMSO al 0,2 % en el volumen final del ensayo. Los datos fueron analizados utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, con un post test de LSD Fisher para cada una de las condiciones ensayadas. Los resultados representan la media y el error estándar de un *pool* con cinco mediciones. Las letras diferentes representan diferencias significativas con un $p < 0,05$.

1.2 Efecto de agonistas y antagonistas de receptores cannabinoides sobre la actividad de la enzima de hidrólisis del 2-araquidonoilglicerol

Los resultados de la actividad de la MAGL muestran que esta no fue modificada por la presencia de los agonistas y/o de los antagonistas de los receptores cannabinoides en las condiciones evaluadas (Fig. 22).

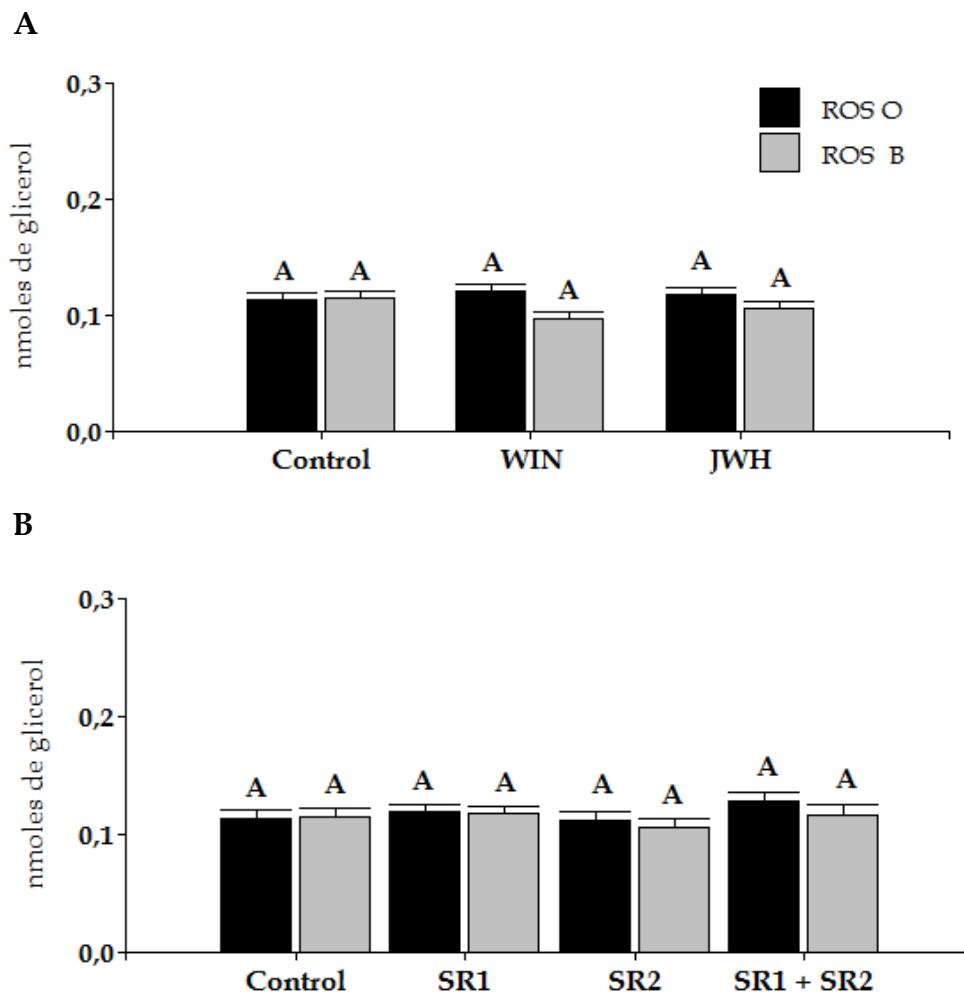


Figura 22. Actividad de la MAGL en ROS O y ROS B preincubados con los agonistas y antagonistas de los receptores cannabinoides. ROS O y ROS B (100 μ g de proteína) fueron preincubados con el agonista de los receptores CB1 y CB2 (WIN55212-2, WIN), el agonista del receptor CB2 (JWH-133, JWH) (A) o con el antagonista del receptor CB1 (SR141716, SR1), del CB2 (SR144528, SR2) o ambos (B), durante 10 minutos. Después de este tiempo se ensayó la actividad de MAGL como se especifica en la Fig. 11. Los ROS controles fueron ensayados en presencia de DMSO al 0,2 % en el volumen final del ensayo. Los datos fueron analizados utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, con un post test de LSD Fisher para cada una de las condiciones ensayadas. Los resultados representan la media y el error estándar de un *pool* con cinco mediciones por cada condición. Las letras diferentes representan diferencias significativas con un $p < 0,05$.

DISCUSIÓN

Dado que el metabolismo del 2-AG se ve modulado por luz, evaluamos como las actividades de las enzimas de síntesis e hidrólisis del 2-AG podrían ser reguladas por proteínas involucradas en el proceso de fototransducción (Resultados segundo capítulo, secciones 1 y 2).

En una primera instancia se evaluó la posible participación de la transducina en la modulación del metabolismo del 2-AG. Para esto se emplearon el GTP γ S y el GDP β S, análogos de nucleótidos no hidrolizables, que facilitan o impiden la disociación de la subunidad T α de la transducina desde su conformación heterotrimérica (T α GDP $\beta\gamma$), respectivamente. La disociación de la T α de la subunidad T $\beta\gamma$ incrementó la actividad de la DAGL en ROS O llevándola al valor en luz (Esquema 17 A). Si bien estos resultados sugieren que esta enzima podría estar regulada por la transducina, no permiten afirmar a que subunidad se debería el efecto. Por otra parte, una proteína G monomérica también podría ser responsable de lo observado, por ejemplo, la presencia de RhoA fue descrita en ROS (Salvador y Giusto, 2006). Otro hallazgo interesante de esta Tesis, lo indica el hecho que en ROS pretratados con GTP γ S no se observa un efecto adicional de la luz. Este resultado sugiere que el nucleótido a la concentración empleada fue suficiente para disociar a la T α no quedando transducina disponible para responder a la luz, o bien que otra proteína G esté involucrada en el efecto. Por otra parte, la ausencia de cambios en la actividad de la DAGL en presencia de GDP β S en los ROS O indicaría una buena situación de oscuridad de la preparación de los ROS. Además, el GDP β S no fue capaz de impedir la estimulación de la actividad de la enzima por el efecto

de la luz. Este resultado podría deberse a que el GDP β S no evitó la disociación de la T α generado por el estímulo lumínico posterior. En apoyo a esto, los Trabajos de Zera y col. (1996) demostraron que el GDP β S fue incapaz de inhibir la activación de la PDE, debido probablemente a una débil unión de este análogo de nucleótido a la transducina como consecuencia de restricciones estructurales (Zera y col., 1996). En estos resultados es importante considerar que la unión del GDP β S a la transducina es 1500 veces más débil que la del GTP γ S (Zera y col., 1996). La otra enzima de síntesis del 2-AG, la LPAP no se vio modificada por acción de los nucleótidos, sin embargo, la liberación de oleato disminuyó por efecto de la luz en ROS O tratados con GDP β S. Estos cambios en la formación de oleato, sin modificación en la producción de MAG, sugieren un efecto sobre PLA1 y descartan la posibilidad de una modificación en la actividad de MAGL acoplada a LPAP. Esto último se ve reforzado por los resultados de la actividad de MAGL observados bajo esta condición experimental (Fig. 15).

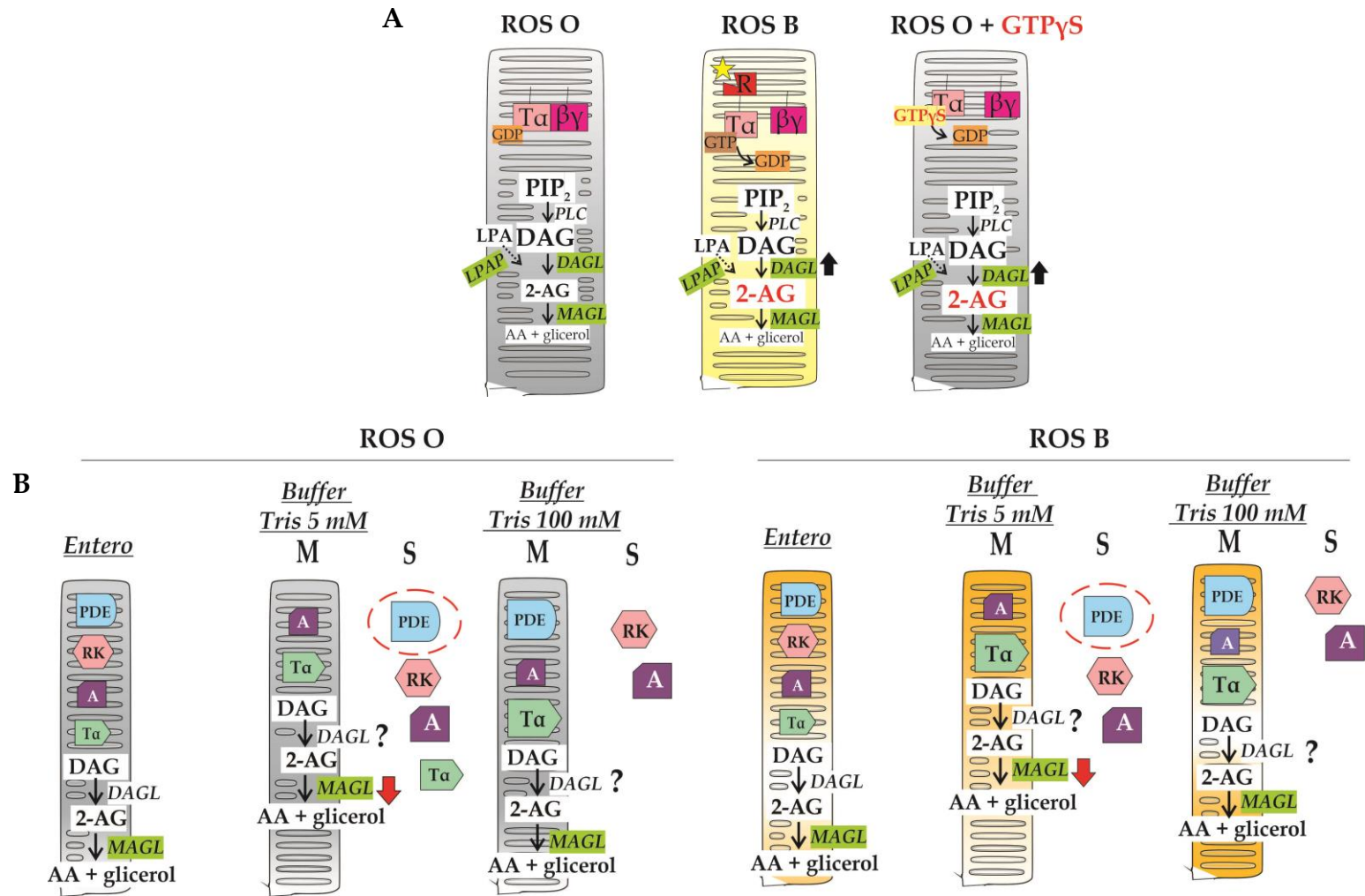
Otro de los objetivos planteados en esta Tesis, en relación al metabolismo del 2-AG y el proceso visual, fue el de evaluar si la extracción selectiva de proteínas involucradas en la fototransducción producía una mayor o menor biodisponibilidad del endocannabinoide. Para tal fin se utilizó el protocolo experimental descrito por Kühn (1982) que permite, mediante el empleo de *buffers* de diferente fuerza iónica y luz, extraer distintas proteínas del proceso visual. El trabajo de Kühn (1982) muestra que a baja fuerza iónica (*buffer* Tris 5 mM) se remueven proteínas solubles y periféricas, y a moderada fuerza iónica (*buffer* Tris 100 mM), proteínas solubles. Además, observó que bajo sus condiciones

experimentales de estímulo lumínico se induce la unión a la membrana de T, RK y arrestina, y que la PDE se extrae a baja fuerza iónica independientemente del estado oscuridad/luz, dado que es una proteína periférica que no se fotoasocia a la membrana (Kuhn, 1982). En relación a lo expuesto los resultados presentados en esta Tesis muestran que las condiciones de iluminación aplicada a los ROS generan la unión de la T α a las membranas tratadas con ambos *buffers*, sin embargo, la RK y la arrestina son extraídas por ambas fuerzas iónicas de manera independiente de la luz (Esquema 17 B). Estos resultados difieren de los observados por Kühn debido probablemente a que la intensidad de luz y el tiempo de exposición de la misma sobre los ROS (3000 luxes, 30 min.) difieren notablemente de lo empleado por Kühn (150 W a 30 cm (no se registran los luxes), 3 min). Resultados similares a los de Kühn fueron reproducidos en trabajos previos de nuestro laboratorio con una iluminación similar a la de este autor (Ilincheta de Boschero y Giusto, 1992).

Se planteó la evaluación de la actividad de las enzimas DAGL y MAGL, que eran modificadas por efecto de la luz, en membranas de ROS tratados a baja y moderada fuerza iónica, en oscuridad y en luz. La actividad de DAGL no fue posible ensayarla debido a la baja actividad presentada en los ROS, por la época del año en que estos fueron obtenidos (noviembre, primavera) (Fig. 17). De hecho, la baja actividad de la DAGL condice con una menor expresión de la enzima. En la figura 7 se observa que en primavera (septiembre-octubre) fue posible medir la actividad de la DAGL, sin embargo, la fecha en la que se realizaron los últimos experimentos (noviembre), si bien fue en primavera, la salida del sol fue a las 5:45 am, coincidente con la hora del amanecer en verano. Por lo tanto, una mayor exposición a la luz

previa a la adaptación en oscuridad pudo haber causado alteraciones en la disponibilidad de la enzima, afectando su actividad.

La disminución en la actividad de MAGL en ROS O y ROS B tratados con *buffer* de baja fuerza iónica es coincidente con la ausencia de la PDE de la membrana del ROS, en ambas condiciones (Esquema 17 B). Esto permite inferir que la PDE estimularía la actividad de MAGL, por lo tanto, en su ausencia se ve una baja en dicha actividad. Es importante resaltar que este resultado no excluye la participación de otras proteínas del proceso de fototransducción en la modulación de la actividad de MAGL. Cabe señalar que la actividad de esta enzima sólo se modifica cuando el estímulo lumínico se aplica a la copa del ojo (Capítulo 1), en consecuencia la actividad de MAGL podría estar regulada, además de por la PDE, por alguna proteína que migraría por efecto de la luz entre el RIS y el ROS, como es el caso de la arrestina. La posibilidad de que la causa en la disminución de la actividad de MAGL (proteína de localización periférica y soluble) se deba a que pueda ser extraída con el *buffer* a baja fuerza iónica queda descartada por la expresión de la enzima en el soluble de ROS 5 mM (Fig. 19).



Esquema 17. Representación de la modulación del metabolismo del 2-AG por las proteínas involucradas en el proceso de fototransducción en el ROS. En la condición de oscuridad (ROS O), la transducina permanece en estado heterotrimérico (TαGDPβγ). Sin embargo, frente a una

señal lumínica (ROS B), la rodopsina (R) detecta la luz y sufre un cambio conformacional en su cromóforo (*R), favoreciendo la disociación de la subunidad alfa ($T\alpha$) de la transducina de la beta gamma ($\beta\gamma$) ocasionada por el intercambio de GDP de la $T\alpha$ por GTP. Para evaluar el rol de la transducina, proteína G involucrada en el proceso de fototransducción, en la modulación de las enzimas encargadas del metabolismo del 2-AG, se empleó el análogo $GTP\gamma S$ que disocia a la transducina en sus subunidades $T\alpha$ y $\beta\gamma$ en ausencia de luz (ROS O + $GTP\gamma S$). Las enzimas del metabolismo del 2-AG (indicadas en color verde) fueron ensayadas en ROS O, ROS B y en ROS O preincubados con $GTP\gamma S$. La actividad de la DAGL fue la única afectada cuando el estímulo de luz es dado sobre el ROS aislado (ROS B) ó en presencia de $GTP\gamma S$ (ROS O + $GTP\gamma S$), observándose un incremento de la actividad similar en ambas condiciones (**A**). El empleo de *buffers* de diferente fuerza iónica y luz, extraen del ROS distintas proteínas involucradas en el proceso visual. El *buffer* de baja fuerza iónica (*buffer* Tris 5 mM) remueve proteínas solubles y periféricas, y el de moderada fuerza iónica (*buffer* Tris 100 mM), proteínas solubles. Se indican en el esquema las proteínas observadas en la fracción de membrana (M) y en la fracción soluble (S), después de efectuados los distintos tratamientos. En estas condiciones se evaluó la actividad de la MAGL, observándose una disminución de esta asociada a la membrana (M) del ROS cuando la PDE era extraída por el buffer 5 mM en ROS O y ROS B (**B**).

Teniendo en cuenta que los distintos receptores que responden a cannabinoides están presentes en el ROS y que algunos de ellos son más (CB1, CB2) o menos (GPR55) expresados en luz se planteó analizar cómo era el comportamiento de las enzimas del metabolismo del 2-AG por acción de agonistas y antagonistas de los receptores cannabinoides, en los ROS mantenidos en oscuridad o expuestos a luz. En el grupo de investigación en el que se desarrolló esta Tesis, empleando el terminal sináptico de corteza cerebral (CC) de rata, se demostró que el metabolismo del 2-AG es afectado por la modulación de los receptores cannabinoides durante el envejecimiento (Pascual y col., 2014). Los resultados presentados en esta Tesis muestran que la actividad de LPAP no se modifica por luz, sin embargo diferencias oscuridad-luz se manifiestan por la acción de los agonistas de los receptores cannabinoides. Si bien WIN y JWH disminuyen la actividad de LPAP en oscuridad y en luz, el efecto es más notorio en esta última condición (Esquema 18). El hecho que ambos agonistas afectan de igual manera la actividad de LPAP en las condiciones evaluadas (ROS O y ROS B), y sabiendo que WIN es agonista del receptor CB1 y CB2 (Felder y col., 1995, D'Ambra y col., 1992) y JWH es agonista específico de CB2 (Huffman y col., 1999), indicaría que el efecto es mediado a través del receptor CB2.

En lo que respecta a la formación de oleato los resultados más relevantes se observan en oscuridad, mientras que el agonista de CB1 y CB2 (WIN) anula su producción, el agonista específico de CB2 (JWH) la incrementa ampliamente (Fig. 20 B). Esto podría sugerir un rol preponderante del CB1 ya que con WIN se estaría anulando el efecto vía CB2 que se observa con JWH.

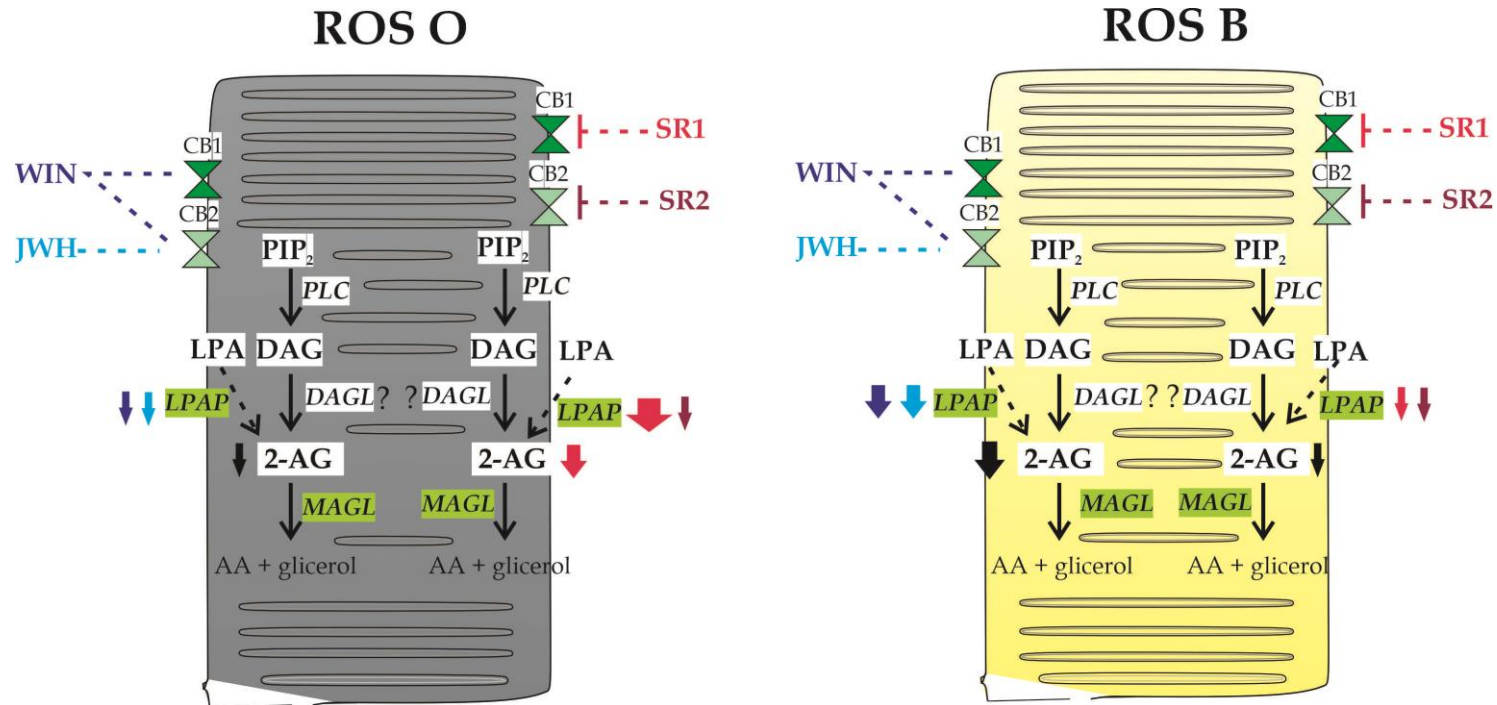
El oleato formado podría deberse a un efecto de los agonistas sobre la actividad de la MAGL, asociada a la de LPAP, o sobre la actividad de PLA1. La primera posibilidad quedaría descartada porque los efectos manifestados en la formación de oleato no se condicen con lo observado en MAG, no mostrando una relación sustrato-producto. Por otra parte, la imposibilidad que el oleato provenga de la actividad de MAGL queda de manifiesto en los resultados de la acción de los agonistas sobre esta enzima donde se observa la falta de efecto por parte de los mismos (Fig. 22 A).

La actividad de LPAP disminuye en presencia de los antagonistas de los receptores CB1 (SR1) y CB2 (SR2), siendo esta disminución más marcada cuando se incubaba con el antagonista del CB1 en condición de oscuridad (Esquema 18). La coincubación con ambos antagonistas mostró resultados similares a los observados con cada uno de ellos de manera individual. Pascual y col. (2014) también observaron una disminución en la actividad de LPAP por el efecto individual de SR1 y SR2. Sin embargo estos autores, a diferencia de nuestros resultados, mostraron que ese efecto inhibitorio era revertido cuando los sinaptosomas de CC de ratas eran incubados con ambos antagonistas.

La actividad de la LPAP fue inhibida tanto por los agonistas como por los antagonistas de los receptores cannabinoides, de estos hallazgos podemos concluir que el efecto de los antagonistas podría deberse a la acción sobre algún otro receptor, heterómeros de receptores o por mecanismos no mediados por receptor. En apoyo a esta posibilidad se ha encontrado que el SR1 además de ser antagonista del receptor CB1 se comporta como agonista del receptor GPR55 (Kapur y col.,

2009). En los últimos años se ha demostrado que el receptor CB1 y CB2 pueden formar heterómeros con el GPR55 (Balenga y col., 2014, Martínez-Pinilla y col., 2014). Además los heterómeros de GPCR (receptores acoplados a proteína G) son actualmente considerados como entidades moleculares nuevas, con señalización y características de ligandos diferentes a cada GPCR cuando es considerado individualmente (Franco y col., 2018, Franco y col., 2016). Por lo tanto, en la modulación de la actividad de la LPAP podrían estar participando otros receptores que responden a cannabinoides, u otros mecanismos aún desconocidos.

Teniendo en cuenta que agonistas/antagonistas de los receptores cannabinoides disminuyen la actividad de LPAP y no modifican la actividad de MAGL podríamos inferir que la modulación de receptores cannabinoides llevaría a una menor disponibilidad de 2-AG, sin embargo para aseverar esto debe ser evaluada la actividad de DAGL, que al momento no fue posible ensayarla debido a la baja actividad presentada en los ROS en la época del año en que estos fueron obtenidos (Capítulo II, Resultados sección A 2.2.1).



Esquema 18. Representación de la modulación de las enzimas responsables del metabolismo del 2-AG por acción de agonistas y antagonistas de los receptores cannabinoides. Las actividades de las enzimas de síntesis e hidrólisis del 2-AG (verde) fueron ensayadas en ROS O y ROS B, previamente tratados con: WIN, agonista de los receptores CB1 y CB2, JWH, agonista específico del receptor CB2, SR1 y SR2 antagonistas de los receptores CB1 y CB2, respectivamente. Los agonistas WIN (azul) y JWH (celeste) disminuyeron la actividad de LPAP en ROS O y ROS B siendo el efecto más marcado en ROS B. La actividad de LPAP también se vio disminuida por los antagonistas de los receptores CB1 (SR1, rosa) y CB2 (SR2, violeta) siendo este efecto más notorio con el antagonista del receptor CB1 en ROS O. Estos resultados indicarían una disminución en la disponibilidad del 2-AG por antagonistas y agonistas en ROS O y ROS B, respectivamente.

CONCLUSIONES

- Los resultados de esta Tesis demuestran la presencia de los diferentes elementos del SEC en segmentos externos de células fotorreceptoras (ROS) los que se ven modificados por el estímulo de luz a la retina.
- Las actividades de las enzimas de síntesis (DAGL y LPAP) e hidrólisis (MAGL) del 2-AG conducen a un incremento de este endocannabinoide en el ROS en respuesta al estímulo lumínico ejercido sobre la retina, que condice con el incremento en los niveles proteicos de los receptores CB1 y CB2 a los cuales este se une.
- Esta Tesis demuestra la presencia en ROS de otros receptores que responden a cannabinoides, el GPR55 y el TRPV1, además de una disminución en la expresión del primero sin cambios en la del segundo por luz.
- Se observa un efecto dual de la luz sobre la actividad y la expresión de DAGL y MAGL, ya que mientras la primera se incrementa, el nivel de proteína enzimática decrece. Esto podría ser una forma de regular la enzima, donde la disminución en la disponibilidad de la proteína podría ayudar a controlar su acción.
- Las variaciones observadas en la expresión y en la actividad de la DAGL, dependiendo de la época del año en la que se obtuvieron los ROS, indican que estas son afectadas por el lapso de tiempo en que la retina “*in vivo*” está expuesta a la luz.
- Los resultados sugieren una regulación de las actividades de DAGL y MAGL por proteínas del proceso de fototransducción, estando involucrada la

transducina, y la PDE y arrestina, respectivamente. Sin embargo, la actividad de LPAP, una de las enzimas responsable de la síntesis del 2-AG, no se ve afectada por el estímulo de luz.

- Los receptores cannabinoides regularían en baja la disponibilidad del 2-AG al menos por modulación de la LPAP, tanto en oscuridad como en luz.

Los resultados de esta Tesis Doctoral demuestran que el SEC participa activamente en la adaptación de los bastones al estímulo lumínico. La modulación de las enzimas de síntesis e hidrólisis del 2-AG en el ROS por efecto de la luz y por el de algunas proteínas del proceso de fototransducción sugiere una contribución del 2-AG en la respuesta a la luz. La presencia de receptores CB1 y CB2, GPR55 y TRPV1 en ROS y su diferente afectación por luz hablaría de un rol funcional particular de cada uno de ellos en el proceso visual, evitando por ejemplo la saturación del sistema fotosensible del ROS e impidiendo el daño por luz.

Los hallazgos que surgen de esta Tesis Doctoral establecen una estrecha relación entre el SEC y el proceso visual y abren dos grandes interrogantes a resolver:

- El rol funcional del SEC y en particular del endocannabinoide neuroprotector 2-AG en procesos patológicos de injuria lumínica que llevan a la destrucción de los fotorreceptores.
- La acción de extractos derivados de *Cannabis* sp. o de sus principios activos en la modulación del tono endógeno del 2-AG en estos modelos patológicos.

BIBLIOGRAFÍA

- Ames A y Hastings AB (1956). *Studies on water and electrolytes in nervous tissue. I. Rabbit retina: methods and interpretation of data.* J Neurophysiol 19:201-212.
- Anderson RE (1982). *Renewal of lipids in rod outer segments.* Methods Enzymol 81:800-806.
- Araujo DSM, Miya-Coreixas VS, Pandolfo P, Calaza KC (2017). *Cannabinoid receptors and TRPA1 on neuroprotection in a model of retinal ischemia.* Exp Eye Res 154:116-125.
- Arshavsky VY y Burns ME (2012). *Photoreceptor signaling: supporting vision across a wide range of light intensities.* J Biol Chem 287:1620-1626.
- Arshavsky VY, Lamb TD, Pugh EN, Jr. (2002). *G proteins and phototransduction.* Annu Rev Physiol 64:153-187.
- Arshavsky VY y Wensel TG (2013). *Timing is everything: GTPase regulation in phototransduction.* Invest Ophthalmol Vis Sci 54:7725-7733.
- Arvidson GA (1968). *Structural and metabolic heterogeneity of rat liver glycerophosphatides.* Eur J Biochem 4:478-486.
- Baehr W, Karan S, Maeda T, Luo DG, Li S, Bronson JD, Watt CB, Yau KW, Frederick JM, Palczewski K (2007). *The function of guanylate cyclase 1 and guanylate cyclase 2 in rod and cone photoreceptors.* J Biol Chem 282:8837-8847.
- Baker RR y Chang H (2000). *A metabolic path for the degradation of lysophosphatidic acid, an inhibitor of lysophosphatidylcholine lysophospholipase, in neuronal nuclei of cerebral cortex.* Biochim Biophys Acta 1483:58-68.
- Balenga NA, Martinez-Pinilla E, Kargl J, Schroder R, Peinhaupt M, Platzer W, Balint Z, Zamarbide M, Dopeso-Reyes IG, Ricobaraza A, Perez-Ortiz JM, Kostenis E, Waldhoer M, Heinemann A, Franco R (2014). *Heteromerization of GPR55 and cannabinoid CB2 receptors modulates signalling.* Br J Pharmacol 171:5387-5406.
- Berne y Levy (2009). *Berne y Levy. Fisiología.* En Koeppen, B M., Stanton, B A (Eds.). Elsevier Health Sciences.
- Bidaut-Russell M y Howlett AC (1991). *Cannabinoid receptor-regulated cyclic AMP accumulation in the rat striatum.* J Neurochem 57:1769-1773.
- Bisogno T, Delton-Vandenbroucke I, Milone A, Lagarde M, Di Marzo, V (1999). *Biosynthesis and inactivation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) and N-docosahexaenylethanolamine in bovine retina.* Arch Biochem Biophys 370:300-307.
- Bisogno T, Howell F, Williams G, Minassi A, Cascio MG, Ligresti A, Matias I, Schiano-Moriello A, Paul P, Williams EJ, Gangadharan U, Hobbs C, Di Marzo, V, Doherty P (2003). *Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain.* J Cell Biol 163:463-468.
- Bisogno T, Melck D, De Petrocellis L, Di Marzo, V (1999). *Phosphatidic acid as the biosynthetic precursor of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in intact mouse neuroblastoma cells stimulated with ionomycin.* J Neurochem 72:2113-2119.

- Blankman JL, Simon GM, Cravatt BF (2007). *A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol*. Chem Biol 14:1347-1356.
- Bouchard JF, Casanova C, Cecyre B, Redmond WJ (2016). *Expression and Function of the Endocannabinoid System in the Retina and the Visual Brain*. Neural Plast 2016:9247057.
- Bouskila J, Burke MW, Zabouri N, Casanova C, Ptito M, Bouchard JF (2012). *Expression and localization of the cannabinoid receptor type 1 and the enzyme fatty acid amide hydrolase in the retina of vervet monkeys*. Neuroscience 202:117-130.
- Bouskila J, Harrar V, Javadi P, Casanova C, Hirabayashi Y, Matsuo I, Ohyama J, Bouchard JF, Ptito M (2016). *Scotopic vision in the monkey is modulated by the G protein-coupled receptor 55*. Vis Neurosci 33:E006.
- Bouskila J, Javadi P, Casanova C, Ptito M, Bouchard JF (2013). *Rod photoreceptors express GPR55 in the adult vervet monkey retina*. PLoS One 8:e81080.
- Burns ME y Pugh EN (2010). *Lessons from photoreceptors: turning off g-protein signaling in living cells*. Physiology (Bethesda) 25:72-84.
- Burstein S (2005). *PPAR-gamma: a nuclear receptor with affinity for cannabinoids*. Life Sci 77:1674-1684.
- Cadas H, Gaillet S, Beltramo M, Venance L, Piomelli D (1996). *Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP*. J Neurosci 16:3934-3942.
- Calandra B, Portier M, Kerneis A, Delpech M, Carillon C, Le FG, Ferrara P, Shire D (1999). *Dual intracellular signaling pathways mediated by the human cannabinoid CB1 receptor*. Eur J Pharmacol 374:445-455.
- Calvert PD, Strissel KJ, Schiesser WE, Pugh EN, Arshavsky VY (2006). *Light-driven translocation of signaling proteins in vertebrate photoreceptors*. Trends Cell Biol 16:560-568.
- Carrier EJ, Kearn CS, Barkmeier AJ, Breese NM, Yang W, Nithipatikom K, Pfister SL, Campbell WB, Hillard CJ (2004). *Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol, which increases proliferation via a CB2 receptor-dependent mechanism*. Mol Pharmacol 65:999-1007.
- Castillo PE, Younts TJ, Chavez AE, Hashimoto Y (2012). *Endocannabinoid signaling and synaptic function*. Neuron 76:70-81.
- Cecyre B, Monette M, Beudjekian L, Casanova C, Bouchard JF (2014). *Localization of diacylglycerol lipase alpha and monoacylglycerol lipase during postnatal development of the rat retina*. Front Neuroanat 8:150.
- Cecyre B, Zabouri N, Huppe-Gourgues F, Bouchard JF, Casanova C (2013). *Roles of cannabinoid receptors type 1 and 2 on the retinal function of adult mice*. Invest Ophthalmol Vis Sci 54:8079-8090.

- Chen J, Matias I, Dinh T, Lu T, Venezia S, Nieves A, Woodward DF, Di Marzo, V (2005). *Finding of endocannabinoids in human eye tissues: implications for glaucoma*. *Biochem Biophys Res Commun* 330:1062-1067.
- Chen X, Zheng C, Qian J, Sutton SW, Wang Z, Lv J, Liu C, Zhou N (2014). *Involvement of beta-arrestin-2 and clathrin in agonist-mediated internalization of the human cannabinoid CB2 receptor*. *Curr Mol Pharmacol* 7:67-80.
- Childers SR, Sexton T, Roy MB (1994). *Effects of anandamide on cannabinoid receptors in rat brain membranes*. *Biochem Pharmacol* 47:711-715.
- Cottone E, Pomatto V, Cerri F, Campantico E, Mackie K, Delpero M, Guastalla A, Dati C, Bovolin P, Franzoni MF (2013). *Cannabinoid receptors are widely expressed in goldfish: molecular cloning of a CB2-like receptor and evaluation of CB1 and CB2 mRNA expression profiles in different organs*. *Fish Physiol Biochem* 39:1287-1296.
- Curcio CA (2001). *Photoreceptor topography in ageing and age-related maculopathy*. *Eye (Lond)* 15:376-383.
- D'Ambra TE, Estep KG, Bell MR, Eissenstat MA, Josef KA, Ward SJ, Haycock DA, Baizman ER, Casiano FM, Beglin NC, (1992). *Conformationally restrained analogues of pravadoline: nanomolar potent, enantioselective, (aminoalkyl)indole agonists of the cannabinoid receptor*. *J Med Chem* 35:124-135.
- Daemen FJ (1973). *Vertebrate rod outer segment membranes*. *Biochim Biophys Acta* 300:255-288.
- Daigle TL, Kearn CS, Mackie K (2008). *Rapid CB1 cannabinoid receptor desensitization defines the time course of ERK1/2 MAP kinase signaling*. *Neuropharmacology* 54:36-44.
- Deretic D (2006). *A role for rhodopsin in a signal transduction cascade that regulates membrane trafficking and photoreceptor polarity*. *Vision Res* 46:4427-4433.
- Deretic D, Williams AH, Ransom N, Morel V, Hargrave PA, Arendt A (2005). *Rhodopsin C terminus, the site of mutations causing retinal disease, regulates trafficking by binding to ADP-ribosylation factor 4 (ARF4)*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:3301-3306.
- Di Marzo, V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D (1994). *Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons*. *Nature* 372:686-691.
- Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, Kathuria S, Piomelli D (2002). *Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10819-10824.
- Dinh TP, Kathuria S, Piomelli D (2004). *RNA interference suggests a primary role for monoacylglycerol lipase in the degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol*. *Mol Pharmacol* 66:1260-1264.
- Dizhoor AM, Olshevskaya EV, Henzel WJ, Wong SC, Stults JT, Ankoudinova I, Hurley JB (1995). *Cloning, sequencing, and expression of a 24-kDa Ca(2+)-binding protein activating photoreceptor guanylyl cyclase*. *J Biol Chem* 270:25200-25206.

- Fain GL, Matthews HR, Cornwall MC, Koutalos Y (2001). *Adaptation in vertebrate photoreceptors*. *Physiol Rev* 81:117-151.
- Fan SF y Yazulla S (2003). *Biphasic modulation of voltage-dependent currents of retinal cones by cannabinoid CB1 receptor agonist WIN 55212-2*. *Vis Neurosci* 20:177-188.
- Farooqui AA, Rammohan KW, Horrocks LA (1989). *Isolation, characterization, and regulation of diacylglycerol lipases from the bovine brain*. *Ann N Y Acad Sci* 559:25-36.
- Farooqui AA, Taylor WA, Horrocks LA (1986). *Characterization and solubilization of membrane bound diacylglycerol lipases from bovine brain*. *Int J Biochem* 18:991-997.
- Felder CC, Briley EM, Axelrod J, Simpson JT, Mackie K, Devane WA (1993). *Anandamide, an endogenous cannabimimetic eicosanoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulates receptor-mediated signal transduction*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:7656-7660.
- Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie K, Blond O, Lai Y, Ma AL, Mitchell RL (1995). *Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors*. *Mol Pharmacol* 48:443-450.
- Fernandez-Ruiz J, Berrendero F, Hernandez ML, Ramos JA (2000). *The endogenous cannabinoid system and brain development*. *Trends Neurosci* 23:14-20.
- Fliesler SJ y Anderson RE (1983). *Chemistry and metabolism of lipids in the vertebrate retina*. *Prog Lipid Res* 22:79-131.
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH (1957). *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues*. *J Biol Chem* 226:497-509.
- Franco R, Aguinaga D, Jimenez J, Lillo J, Martinez-Pinilla E, Navarro G (2018). *Biased receptor functionality versus biased agonism in G-protein-coupled receptors*. *Biomol Concepts* 9:143-154.
- Franco R, Martinez-Pinilla E, Lanciego JL, Navarro G (2016). *Basic Pharmacological and Structural Evidence for Class A G-Protein-Coupled Receptor Heteromerization*. *Front Pharmacol* 7:76.
- Fride E (2008). *Multiple roles for the endocannabinoid system during the earliest stages of life: pre- and postnatal development*. *J Neuroendocrinol* 20 Suppl 1:75-81.
- Gaveglio VL (2012). *Mediadores lipídicos generados a partir del ácido fosfatídico. Rol en la señalización nuclear en el sistema nervioso central*. [Tesis doctoral, Universidad Nacional del Sur]. Repositorio Digital Institucional de la Biblioteca Central "Profesor Nicolás Matijevic" de la Universidad Nacional del Sur. <http://repositoriodigital.uns.edu.ar/handle/123456789/2260>
- Gaveglio VL, Pasquare SJ, Giusto NM (2011). *Metabolic pathways for the degradation of phosphatidic acid in isolated nuclei from cerebellar cells*. *Arch Biochem Biophys* 507:271-280.
- Ghalayini A y Anderson RE (1984). *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: light-mediated breakdown in the vertebrate retina*. *Biochem Biophys Res Commun* 124:503-506.

- Ghalayini AJ y Anderson RE (1992). *Activation of bovine rod outer segment phospholipase C by arrestin*. J Biol Chem 267:17977-17982.
- Ghalayini AJ y Anderson RE (1995). *Light adaptation of bovine retinas in situ stimulates phosphatidylinositol synthesis in rod outer segments in vitro*. Curr Eye Res 14:1025-1029.
- Ghalayini AJ, Tarver AP, Mackin WM, Koutz CA, Anderson RE (1991). *Identification and immunolocalization of phospholipase C in bovine rod outer segments*. J Neurochem 57:1405-1412.
- Ghalayini AJ, Weber NR, Rundle DR, Koutz CA, Lambert D, Guo XX, Anderson RE (1998). *Phospholipase C γ 1 in bovine rod outer segments: immunolocalization and light-dependent binding to membranes*. J Neurochem 70:171-178.
- Giusto NM y Bazan NG (1979). *Phospholipids and acylglycerols biosynthesis and ^{14}C production from [^{14}C]glycerol in the bovine retina: the effects of incubation time, oxygen and glucose*. Exp Eye Res 29:155-168.
- Giusto NM, Pasquare SJ, Salvador GA, Castagnet PI, Roque ME, Ilincheta de Boschero MG (2000). *Lipid metabolism in vertebrate retinal rod outer segments*. Prog Lipid Res 39:315-391.
- Giusto NM, Pasquare SJ, Salvador GA, Ilincheta de Boschero MG (2010). *Lipid second messengers and related enzymes in vertebrate rod outer segments*. J Lipid Res 51:685-700.
- Glass M y Felder CC (1997). *Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor*. J Neurosci 17:5327-5333.
- Harvey BS, Ohlsson KS, Maag JL, Musgrave IF, Smid SD (2012). *Contrasting protective effects of cannabinoids against oxidative stress and amyloid-beta evoked neurotoxicity in vitro*. Neurotoxicology 33:138-146.
- Hashimoto-dani Y, Ohno-Shosaku T, Kano M (2007). *Endocannabinoids and synaptic function in the CNS*. Neuroscientist 13:127-137.
- Hayashi F y Amakawa T (1985). *Light-mediated breakdown of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate in isolated rod outer segments of frog photoreceptor*. Biochem Biophys Res Commun 128:954-959.
- Hessel E, Muller P, Herrmann A, Hofmann KP (2001). *Light-induced reorganization of phospholipids in rod disc membranes*. J Biol Chem 276:2538-2543.
- Ho KW, Ward NJ, Calkins DJ (2012). *TRPV1: a stress response protein in the central nervous system*. Am J Neurodegener Dis 1:1-14.
- Hoon M, Okawa H, Della SL, Wong RO (2014). *Functional architecture of the retina: development and disease*. Prog Retin Eye Res 42:44-84.
- Howlett AC (2005). *Cannabinoid receptor signaling*. Handb Exp Pharmacol :53-79.

- Hu SS, Arnold A, Hutchens JM, Radicke J, Cravatt BF, Wager-Miller J, Mackie K, Straiker A (2010). *Architecture of cannabinoid signaling in mouse retina*. J Comp Neurol 518:3848-3866.
- Huang FD, Matthies HJ, Speese SD, Smith MA, Broadie K (2004). *Rolling blackout, a newly identified PIP₂-DAG pathway lipase required for Drosophila phototransduction*. Nat Neurosci 7:1070-1078.
- Huffman JW, Liddle J, Yu S, Aung MM, Abood ME, Wiley JL, Martin BR (1999). *3-(1',1'-Dimethylbutyl)-1-deoxy-delta⁸-THC and related compounds: synthesis of selective ligands for the CB₂ receptor*. Bioorg Med Chem 7:2905-2914.
- Huttl S, Michalakakis S, Seeliger M, Luo DG, Acar N, Geiger H, Hudl K, Mader R, Haverkamp S, Moser M, Pfeifer A, Gerstner A, Yau KW, Biel M (2005). *Impaired channel targeting and retinal degeneration in mice lacking the cyclic nucleotide-gated channel subunit CNGB1*. J Neurosci 25:130-138.
- Iannotti FA, Di Marzo, V, Petrosino S (2016). *Endocannabinoids and endocannabinoid-related mediators: Targets, metabolism and role in neurological disorders*. Prog Lipid Res 62:107-128.
- Ibsen MS, Finlay DB, Patel M, Javitch JA, Glass M, Grimsey NL (2019). *Cannabinoid CB₁ and CB₂ Receptor-Mediated Arrestin Translocation: Species, Subtype, and Agonist-Dependence*. Front Pharmacol 10:350.
- Ilincheta de Boschero MG y Giusto NM (1992). *Phosphatidic acid and polyphosphoinositide metabolism in rod outer segments. Differential role of soluble and peripheral proteins*. Biochim Biophys Acta 1127:105-115.
- Imamura T, Tsuruma K, Inoue Y, Otsuka T, Ohno Y, Ogami S, Yamane S, Shimazawa M, Hara H (2017). *Rimonabant, a selective cannabinoid₁ receptor antagonist, protects against light-induced retinal degeneration in vitro and in vivo*. Eur J Pharmacol 803:78-83.
- Imamura T, Tsuruma K, Inoue Y, Otsuka T, Ohno Y, Ogami S, Yamane S, Shimazawa M, Hara H (2018). *Involvement of cannabinoid receptor type 2 in light-induced degeneration of cells from mouse retinal cell line in vitro and mouse photoreceptors in vivo*. Exp Eye Res 167:44-50.
- Insinna C y Besharse JC (2008). *Intraflagellar transport and the sensory outer segment of vertebrate photoreceptors*. Dev Dyn 237:1982-1992.
- Jung KM, Astarita G, Zhu C, Wallace M, Mackie K, Piomelli D (2007). *A key role for diacylglycerol lipase-alpha in metabotropic glutamate receptor-dependent endocannabinoid mobilization*. Mol Pharmacol 72:612-621.
- Kang JH, Toita R, Kim CW, Katayama Y (2012). *Protein kinase C (PKC) isozyme-specific substrates and their design*. Biotechnol Adv 30:1662-1672.
- Kapur A, Zhao P, Sharir H, Bai Y, Caron MG, Barak LS, Abood ME (2009). *Atypical responsiveness of the orphan receptor GPR55 to cannabinoid ligands*. J Biol Chem 284:29817-29827.

- Kerov V, Chen D, Moussaif M, Chen YJ, Chen CK, Artemyev NO (2005). *Transducin activation state controls its light-dependent translocation in rod photoreceptors*. J Biol Chem 280:41069-41076.
- Kokona D y Thermos K (2015). *Synthetic and endogenous cannabinoids protect retinal neurons from AMPA excitotoxicity in vivo, via activation of CB1 receptors: Involvement of PI3K/Akt and MEK/ERK signaling pathways*. Exp Eye Res 136:45-58.
- Kozak KR, Rowlinson SW, Marnett LJ (2000). *Oxygenation of the endocannabinoid, 2-arachidonylglycerol, to glyceryl prostaglandins by cyclooxygenase-2*. J Biol Chem 275:33744-33749.
- Krizaj D y Copenhagen DR (2002). *Calcium regulation in photoreceptors*. Front Biosci 7:d2023-d2044.
- Kuhn H (1982). *Light-regulated binding of proteins to photoreceptor membranes and its use for the purification of several rod cell proteins*. Methods Enzymol 81:556-564.
- Labar G, Bauvois C, Borel F, Ferrer JL, Wouters J, Lambert DM (2010). *Crystal structure of the human monoacylglycerol lipase, a key actor in endocannabinoid signaling*. Chembiochem 11:218-227.
- Laemmli UK (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature 227:680-685.
- Lalonde MR, Jollimore CA, Stevens K, Barnes S, Kelly ME (2006). *Cannabinoid receptor-mediated inhibition of calcium signaling in rat retinal ganglion cells*. Mol Vis 12:1160-1166.
- Lamb TD y Pugh EN (2004). *Dark adaptation and the retinoid cycle of vision*. Prog Retin Eye Res 23:307-380.
- Leung HT, Tseng-Crank J, Kim E, Mahapatra C, Shino S, Zhou Y, An L, Doerge RW, Pak WL (2008). *DAG lipase activity is necessary for TRP channel regulation in Drosophila photoreceptors*. Neuron 58:884-896.
- Liu J, Wang L, Harvey-White J, Osei-Hyiaman D, Razdan R, Gong Q, Chan AC, Zhou Z, Huang BX, Kim HY, Kunos G (2006). *A biosynthetic pathway for anandamide*. Proc Natl Acad Sci U S A 103:13345-13350.
- Lobanova ES, Finkelstein S, Song H, Tsang SH, Chen CK, Sokolov M, Skiba NP, Arshavsky VY (2007). *Transducin translocation in rods is triggered by saturation of the GTPase-activating complex*. J Neurosci 27:1151-1160.
- Lograno MD y Romano MR (2004). *Cannabinoid agonists induce contractile responses through Gi/o-dependent activation of phospholipase C in the bovine ciliary muscle*. Eur J Pharmacol 494:55-62.
- Lopez EM, Tagliaferro P, Onaivi ES, Lopez-Costa JJ (2011). *Distribution of CB2 cannabinoid receptor in adult rat retina*. Synapse 65:388-392.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem 193:265-275.

- Lykidis A, Mougios V, Arzoglou P (1994). *Pancreatic lipase assays with triglycerides as substrate: contribution of each sequential reaction to product formation*. Clin Chem 40:2053-2056.
- Maccarone R, Rapino C, Zerti D, Di Tommaso M, Battista N, Di Marzo S, Bisti S, Maccarrone M (2016). *Modulation of Type-1 and Type-2 Cannabinoid Receptors by Saffron in a Rat Model of Retinal Neurodegeneration*. PLoS One 11:e0166827.
- Mackie K (2005). *Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system*. Handb Exp Pharmacol :299-325.
- Makino CL, Dodd RL, Chen J, Burns ME, Roca A, Simon MI, Baylor DA (2004). *Recoverin regulates light-dependent phosphodiesterase activity in retinal rods*. J Gen Physiol 123:729-741.
- Maneuf YP y Brotchie JM (1997). *Paradoxical action of the cannabinoid WIN 55,212-2 in stimulated and basal cyclic AMP accumulation in rat globus pallidus slices*. Br J Pharmacol 120:1397-1398.
- Martinez-Pinilla E, Reyes-Resina I, Onatibia-Astibia A, Zamarbide M, Ricobaraza A, Navarro G, Moreno E, Dopeso-Reyes IG, Sierra S, Rico AJ, Roda E, Lanciego JL, Franco R (2014). *CB1 and GPR55 receptors are co-expressed and form heteromers in rat and monkey striatum*. Exp Neurol 261:44-52.
- Martinez-Pinilla E, Rico AJ, Rivas-Santisteban R, Lillo J, Roda E, Navarro G, Lanciego JL, Franco R (2020). *Expression of GPR55 and either cannabinoid CB1 or CB2 heteroreceptor complexes in the caudate, putamen, and accumbens nuclei of control, parkinsonian, and dyskinetic non-human primates*. Brain Struct Funct 225:2153-2164.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990). *Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA*. Nature 346:561-564.
- Maurelli S, Bisogno T, De Perocellis L, Di Luccia A, Marino G, Di Marzo V (1995). *Two novel classes of neuroactive fatty acid amides are substrates for mouse neuroblastoma 'anandamide amidohydrolase'*. FEBS Lett 377:82-86.
- McCulloch DL, Marmor MF, Brigell MG, Hamilton R, Holder GE, Tzekov R, Bach M (2015). *ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2015 update)*. Doc Ophthalmol 130:1-12.
- Meister M y Tessier-Lavigne M. (2012). *Low-Level Visual Processing: The Retina*. En Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum S, Hudspeth A J (Eds.) Principles of Neural Science, Fifth Edition: Edition 5 (pp. 577-601). McGraw Hill Professional.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S., Hudspeth, A. J., & Mack, S. (Eds.). (2000). *Principles of neural science* (Vol. 4, pp. 1227-1246). New York: McGraw-hill.
- Millar FA, Fisher SC, Muir CA, Edwards E, Hawthorne JN (1988). *Polyphosphoinositide hydrolysis in response to light stimulation of rat and chick retina and retinal rod outer segments*. Biochim Biophys Acta 970:205-211.

- Minke B (1982). *Light-induced reduction in excitation efficiency in the trp mutant of Drosophila*. J Gen Physiol 79:361-385.
- Minke B y Parnas M (2006). *Insights on TRP channels from in vivo studies in Drosophila*. Annu Rev Physiol 68:649-684.
- Molday RS y Moritz OL (2015). *Photoreceptors at a glance*. J Cell Sci 128:4039-4045.
- Montell C, Jones K, Hafen E, Rubin G (1985). *Rescue of the Drosophila phototransduction mutation trp by germline transformation*. Science 230:1040-1043.
- Moody JS, Kozak KR, Ji C, Marnett LJ (2001). *Selective oxygenation of the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol by leukocyte-type 12-lipoxygenase*. Biochemistry 40:861-866.
- Morrison WR y Smith LM (1964). *Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol*. J Lipid Res 5:600-608.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M (1993). *Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids*. Nature 365:61-65.
- Nakane S, Oka S, Arai S, Waku K, Ishima Y, Tokumura A, Sugiura T (2002). *2-Arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphate, an arachidonic acid-containing lysophosphatidic acid: occurrence and rapid enzymatic conversion to 2-arachidonoyl-sn-glycerol, a cannabinoid receptor ligand, in rat brain*. Arch Biochem Biophys 402:51-58.
- Natalini PM (2014). *Las diacilglicerol quinasas en los núcleos de las células fotorreceptoras de la retina bovina. Efectos de la luz y de la insulina*. [Tesis doctoral, Universidad Nacional del Sur]. Repositorio Digital Institucional de la Biblioteca Central "Profesor Nicolás Matijevic" de la Universidad Nacional del Sur. <http://repositoriodigital.uns.edu.ar/handle/123456789/2325>
- Natalini PM, Zulian SE, Illicheta de Boschero MG, Giusto NM (2013). *Diacylglycerol kinase epsilon in bovine and rat photoreceptor cells. Light-dependent distribution in photoreceptor cells*. Exp Eye Res 112:139-150.
- Nucci C, Gasperi V, Tartaglione R, Cerulli A, Terrinoni A, Bari M, De Simone C, Finazzi Agro A, Morrone LA, Corasaniti MT, Bagetta G, Maccarrone M (2007). *Involvement of the endocannabinoid system in retinal damage after high intraocular pressure-induced ischemia in rats*. Invest Ophthalmol Vis Sci 48:2997-3004.
- Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N (2004). *Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners*. J Biol Chem 279:5298-5305.
- Orisme W, Li J, Goldmann T, Bolch S, Wolfrum U, Smith WC (2010). *Light-dependent translocation of arrestin in rod photoreceptors is signaled through a phospholipase C cascade and requires ATP*. Cell Signal 22:447-456.
- Pagano RE y Longmuir KJ (1985). *Phosphorylation, transbilayer movement, and facilitated intracellular transport of diacylglycerol are involved in the uptake of a fluorescent analog of phosphatidic acid by cultured fibroblasts*. J Biol Chem 260:1909-1916.

- Palczewski K, Subbaraya I, Gorczyca WA, Helekar BS, Ruiz CC, Ohguro H, Huang J, Zhao X, Crabb JW, Johnson RS (1994). *Molecular cloning and characterization of retinal photoreceptor guanylyl cyclase-activating protein*. *Neuron* 13:395-404.
- Papermaster DS y Dreyer WJ (1974). *Rhodopsin content in the outer segment membranes of bovine and frog retinal rods*. *Biochemistry* 13:2438-2444.
- Pascual AC, Gaveglio VL, Giusto NM, Pasquare SJ (2013). *Aging modifies the enzymatic activities involved in 2-arachidonoylglycerol metabolism*. *Biofactors* 39:209-220.
- Pascual AC, Gaveglio VL, Giusto NM, Pasquare SJ (2014). *Cannabinoid receptor-dependent metabolism of 2-arachidonoylglycerol during aging*. *Exp Gerontol* 55:134-142.
- Pasquare de Garcia SJ y Giusto NM (1986). *Phosphatidate phosphatase activity in isolated rod outer segment from bovine retina*. *Biochim Biophys Acta* 875:195-202.
- Pasquare SJ, Salvador GA, Giusto NM (2008). *Involvement of lysophosphatidic acid, sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate in the metabolism of phosphatidic acid by lipid phosphate phosphatases in bovine rod outer segments*. *Neurochem Res* 33:1205-1215.
- Pasquare SJ, Salvador GA, Roque ME, Giusto NM (2000). *Effect of light on phosphatidate phosphohydrolase activity of retina rod outer segments: the role of transducin*. *Arch Biochem Biophys* 379:299-306.
- Pearring JN, Salinas RY, Baker SA, Arshavsky VY (2013). *Protein sorting, targeting and trafficking in photoreceptor cells*. *Prog Retin Eye Res* 36:24-51.
- Peng YW, Rhee SG, Yu WP, Ho YK, Schoen T, Chader GJ, Yau KW (1997). *Identification of components of a phosphoinositide signaling pathway in retinal rod outer segments*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1995-2000.
- Piomelli D (2003). *The molecular logic of endocannabinoid signalling*. *Nat Rev Neurosci* 4:873-884.
- Piomelli D (2014). *More surprises lying ahead. The endocannabinoids keep us guessing*. *Neuropharmacology* 76 Pt B:228-234.
- Prescott SM y Majerus PW (1983). *Characterization of 1,2-diacylglycerol hydrolysis in human platelets. Demonstration of an arachidonoyl-monoacylglycerol intermediate*. *J Biol Chem* 258:764-769.
- Pugh EN (2006). *RGS expression level precisely regulates the duration of rod photoresponses*. *Neuron* 51:391-393.
- Rajala RV, McClellan ME, Ash JD, Anderson RE (2002). *In vivo regulation of phosphoinositide 3-kinase in retina through light-induced tyrosine phosphorylation of the insulin receptor beta-subunit*. *J Biol Chem* 277:43319-43326.
- Rapino C, Tortolani D, Scipioni L, Maccarrone M (2018). *Neuroprotection by (endo)Cannabinoids in Glaucoma and Retinal Neurodegenerative Diseases*. *Curr Neuropharmacol* 16:959-970.

- Reisenberg M, Singh PK, Williams G, Doherty P (2012). *The diacylglycerol lipases: structure, regulation and roles in and beyond endocannabinoid signalling*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367:3264-3275.
- Rimmerman N, Hughes HV, Bradshaw HB, Pazos MX, Mackie K, Prieto AL, Walker JM (2008). *Compartmentalization of endocannabinoids into lipid rafts in a dorsal root ganglion cell line*. *Br J Pharmacol* 153:380-389.
- Rinaldi-Carmona M, Barth F, Heaulme M, Alonso R, Shire D, Congy C, Soubrie P, Breliere JC, Le Fur G (1995). *Biochemical and pharmacological characterisation of SR141716A, the first potent and selective brain cannabinoid receptor antagonist*. *Life Sci* 56:1941-1947.
- Rinaldi-Carmona M, Barth F, Millan J, Derocq JM, Casellas P, Congy C, Oustric D, Sarran M, Bouaboula M, Calandra B, Portier M, Shire D, Breliere JC, Le Fur G (1998). *SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB2 cannabinoid receptor*. *J Pharmacol Exp Ther* 284:644-650.
- Rosenberger TA, Farooqui AA, Horrocks LA (2007). *Bovine brain diacylglycerol lipase: substrate specificity and activation by cyclic AMP-dependent protein kinase*. *Lipids* 42:187-195.
- Ryberg E, Larsson N, Sjogren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ (2007). *The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor*. *Br J Pharmacol* 152:1092-1101.
- Salvador GA y Giusto NM (2006). *Phospholipase D from photoreceptor rod outer segments is a downstream effector of RhoA: evidence of a light-dependent mechanism*. *Exp Eye Res* 83:202-211.
- Sappington RM, Sidorova T, Long DJ, Calkins DJ (2009). *TRPV1: contribution to retinal ganglion cell apoptosis and increased intracellular Ca²⁺ with exposure to hydrostatic pressure*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:717-728.
- Sappington RM, Sidorova T, Ward NJ, Chakravarthy R, Ho KW, Calkins DJ (2015). *Activation of transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) influences how retinal ganglion cell neurons respond to pressure-related stress*. *Channels (Austin)* 9:102-113.
- Savinainen JR, Kansanen E, Pantsar T, Navia-Paldanius D, Parkkari T, Lehtonen M, Laitinen T, Nevalainen T, Poso A, Levonen AL, Laitinen JT (2014). *Robust hydrolysis of prostaglandin glycerol esters by human monoacylglycerol lipase (MAGL)*. *Mol Pharmacol* 86:522-535.
- Savinainen JR, Saario SM, Laitinen JT (2012). *The serine hydrolases MAGL, ABHD6 and ABHD12 as guardians of 2-arachidonoylglycerol signalling through cannabinoid receptors*. *Acta Physiol (Oxf)* 204:267-276.
- Schlicker E y Kathmann M (2001). *Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors*. *Trends Pharmacol Sci* 22:565-572.
- Schlosburg JE, Blankman JL, Long JZ, Nomura DK, Pan B, Kinsey SG, Nguyen PT, Ramesh D, Booker L, Burston JJ, Thomas EA, Selley DE, Sim-Selley LJ, Liu QS, Lichtman AH,

- Cravatt BF (2010). *Chronic monoacylglycerol lipase blockade causes functional antagonism of the endocannabinoid system*. Nat Neurosci 13:1113-1119.
- Schubert C, Hirsch JA, Gurevich VV, Engelman DM, Sigler PB, Fleming KG (1999). *Visual arrestin activity may be regulated by self-association*. J Biol Chem 274:21186-21190.
- Scotter EL, Abood ME, Glass M (2010). *The endocannabinoid system as a target for the treatment of neurodegenerative disease*. Br J Pharmacol 160:480-498.
- Shen Y, Heimel JA, Kamermans M, Peachey NS, Gregg RG, Nawy S (2009). *A transient receptor potential-like channel mediates synaptic transmission in rod bipolar cells*. J Neurosci 29:6088-6093.
- Simon GM y Cravatt BF (2006). *Endocannabinoid biosynthesis proceeding through glycerophospho-N-acyl ethanolamine and a role for alpha/beta-hydrolase 4 in this pathway*. J Biol Chem 281:26465-26472.
- Slusar JE, Cairns EA, Szczesniak AM, Bradshaw HB, Di PA, Kelly ME (2013). *The fatty acid amide hydrolase inhibitor, URB597, promotes retinal ganglion cell neuroprotection in a rat model of optic nerve axotomy*. Neuropharmacology 72:116-125.
- Smart D, Gunthorpe MJ, Jerman JC, Nasir S, Gray J, Muir AI, Chambers JK, Randall AD, Davis JB (2000). *The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1)*. Br J Pharmacol 129:227-230.
- Smith HG y Litman BJ (1982). *Preparation of osmotically intact rod outer segment disks by Ficoll flotation*. Methods Enzymol 81:57-61.
- Sokolov M, Lyubarsky AL, Strissel KJ, Savchenko AB, Govardovskii VI, Pugh EN, Jr., Arshavsky VY (2002). *Massive light-driven translocation of transducin between the two major compartments of rod cells: a novel mechanism of light adaptation*. Neuron 34:95-106.
- Stella N, Schweitzer P, Piomelli D (1997). *A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation*. Nature 388:773-778.
- Straiker A, Stella N, Piomelli D, Mackie K, Karten HJ, Maguire G (1999). *Cannabinoid CB1 receptors and ligands in vertebrate retina: localization and function of an endogenous signaling system*. Proc Natl Acad Sci U S A 96:14565-14570.
- Straiker A y Sullivan JM (2003). *Cannabinoid receptor activation differentially modulates ion channels in photoreceptors of the tiger salamander*. J Neurophysiol 89:2647-2654.
- Strissel KJ, Lishko PV, Trieu LH, Kennedy MJ, Hurley JB, Arshavsky VY (2005). *Recoverin undergoes light-dependent intracellular translocation in rod photoreceptors*. J Biol Chem 280:29250-29255.
- Sun YX, Tsuboi K, Okamoto Y, Tonai T, Murakami M, Kudo I, Ueda N (2004). *Biosynthesis of anandamide and N-palmitoylethanolamine by sequential actions of phospholipase A2 and lysophospholipase D*. Biochem J 380:749-756.
- Tam BM, Moritz OL, Papermaster DS (2004). *The C terminus of peripherin/rds participates in rod outer segment targeting and alignment of disk incisures*. Mol Biol Cell 15:2027-2037.

- Tsumura M, Sobhan U, Muramatsu T, Sato M, Ichikawa H, Sahara Y, Tazaki M, Shibukawa Y (2012). *TRPV1-mediated calcium signal couples with cannabinoid receptors and sodium-calcium exchangers in rat odontoblasts*. *Cell Calcium* 52:124-136.
- Tsutsumi T, Kobayashi T, Ueda H, Yamauchi E, Watanabe S, Okuyama H (1994). *Lysophosphoinositide-specific phospholipase C in rat brain synaptic plasma membranes*. *Neurochem Res* 19:399-406.
- Turner H, Fleig A, Stokes A, Kinet JP, Penner R (2003). *Discrimination of intracellular calcium store subcompartments using TRPV1 (transient receptor potential channel, vanilloid subfamily member 1) release channel activity*. *Biochem J* 371:341-350.
- Ueda H, Kobayashi T, Kishimoto M, Tsutsumi T, Okuyama H (1993). *A possible pathway of phosphoinositide metabolism through EDTA-insensitive phospholipase A1 followed by lysophosphoinositide-specific phospholipase C in rat brain*. *J Neurochem* 61:1874-1881.
- Valenti M, Vigano D, Casico MG, Rubino T, Steardo L, Parolaro D, Di Marzo, V (2004). *Differential diurnal variations of anandamide and 2-arachidonoyl-glycerol levels in rat brain*. *Cell Mol Life Sci* 61:945-950.
- Van der Stelt M y Di Marzo, V (2005). *Anandamide as an intracellular messenger regulating ion channel activity*. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 77:111-122.
- Viswanathan S, Frishman LJ, Robson JG, Harwerth RS, Smith EL, III (1999). *The photopic negative response of the macaque electroretinogram: reduction by experimental glaucoma*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:1124-1136.
- Ward NJ, Ho KW, Lambert WS, Weitlauf C, Calkins DJ (2014). *Absence of transient receptor potential vanilloid-1 accelerates stress-induced axonopathy in the optic projection*. *J Neurosci* 34:3161-3170.
- Wensel TG (2008). *Signal transducing membrane complexes of photoreceptor outer segments*. *Vision Res* 48:2052-2061.
- Woodward DF, Carling RW, Cornell CL, Fliri HG, Martos JL, Pettit SN, Liang Y, Wang JW (2008). *The pharmacology and therapeutic relevance of endocannabinoid derived cyclooxygenase (COX)-2 products*. *Pharmacol Ther* 120:71-80.
- Yazulla S (2008). *Endocannabinoids in the retina: from marijuana to neuroprotection*. *Prog Retin Eye Res* 27:501-526.
- Yazulla S, Studholme KM, McIntosh HH, Deutsch DG (1999). *Immunocytochemical localization of cannabinoid CB1 receptor and fatty acid amide hydrolase in rat retina*. *J Comp Neurol* 415:80-90.
- Yazulla S, Studholme KM, McIntosh HH, Fan SF (2000). *Cannabinoid receptors on goldfish retinal bipolar cells: electron-microscope immunocytochemistry and whole-cell recordings*. *Vis Neurosci* 17:391-401.
- Yuan C, Chen H, Anderson RE, Kuwata O, Ebrey TG (1998). *The unique lipid composition of gecko (Gekko Gekko) photoreceptor outer segment membranes*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 120:785-789.

- Zera EM, Molloy DP, Angleson JK, Lamture JB, Wensel TG, Malinski JA (1996). *Low affinity interactions of GDPbetaS and ribose- or phosphoryl-substituted GTP analogues with the heterotrimeric G protein, transducin*. J Biol Chem 271:12925-12931.
- Zhang CQ, Wu HJ, Wang SY, Yin S, Lu XJ, Miao Y, Wang XH, Yang XL, Wang Z (2013). *Suppression of outward K(+) currents by WIN55212-2 in rat retinal ganglion cells is independent of CB1/CB2 receptors*. Neuroscience 253:183-193.
- Zhou Y, Howell FV, Glebov OO, Albrecht D, Williams G, Doherty P (2016). *Regulated endosomal trafficking of Diacylglycerol lipase alpha (DAGLalpha) generates distinct cellular pools; implications for endocannabinoid signaling*. Mol Cell Neurosci 76:76-86.
- Zimov S y Yazulla S (2004). *Localization of vanilloid receptor 1 (TRPV1/VR1)-like immunoreactivity in goldfish and zebrafish retinas: restriction to photoreceptor synaptic ribbons*. J Neurocytol 33:441-452.
- Zou S, Kumar U (2018). *Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System*. Int J Mol Sci 19
- Zygmunt PM, Ermund A, Movahed P, Andersson DA, Simonsen C, Jonsson BA, Blomgren A, Birnir B, Bevan S, Eschalier A, Mallet C, Gomis A, Hogestatt ED (2013). *Monoacylglycerols activate TRPV1--a link between phospholipase C and TRPV1*. PLoS One 8:e81618.

TRABAJOS PUBLICADOS

Estefanía Chamorro Aguirre, Virginia L. Gaveglio, Susana J. Pasquaré. “The Endocannabinoid System is Present in Rod Outer Segments from Retina and is Modulated by Light”. *Molecular Neurobiology* (2019). <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1603-5>.

Ana Clara Pascual, # **Estefania Chamorro Aguirre**, Pablo G. Milano, Marisol C. Bocetti, Susana J. Pasquaré. Towards a better method of cannabinoid extraction and preservation for cannabis-based products (enviado para su publicación a *Cannabis and Cannabinoid Research*). # Estos autores contribuyeron igualmente en el presente trabajo.

PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTÍFICAS

- **Chamorro Aguirre E.**, Gaveglio V.L., Pascual A.C., Pasquaré S.J. La actividad de la monoacilglicerol lipasa asociada al segmento externo de los bastones retinianos es regulada por las proteínas involucradas en el proceso de fototransducción. XIII Congreso Nacional De Investigación En Visión y Oftalmología (AIVO), Formato Virtual, octubre 28-30, 2021.
- **Chamorro Aguirre E.**, Pascual A.C., Milano P.G., Bocetti M.C. Pasquaré S.J. Towards a better methods of cannabinoid extraction and preservation for Cannabis-based products, Mar de Plata, Argentina, noviembre 13-16, 2019.
- Pascual A.C., **Chamorro Aguirre E.**, Gaveglio V.L., Pasquaré S.J. El rol del sistema endocannabinoide y su regulación en procesos fisiológicos y patológicos del sistema nervioso central. EXPOCANNABIS Argentina, Buenos Aires, Argentina, agosto 4-6, 2019.
- **Chamorro Aguirre, E.**, Gaveglio V.L., Pasquaré, S.J. El estímulo lumínico modula el metabolismo del 2-araquidonoilglicerol en los segmentos externos de los bastones de la retina bovina. VII Jornadas de Bioquímica y Biología molecular de Lípidos y Lipoproteínas, Mendoza, Argentina, agosto 14-16, 2019.
- **Chamorro Aguirre, E.**, Gaveglio V.L., Pasquaré, S.J. El sistema endocannabinoide es modulado por estímulo lumínico en el segmento externo de los bastones de retina bovina. XII Congreso Nacional de Investigación en Visión y Oftalmología, Córdoba, Argentina, octubre 26-27, 2018.
- **Chamorro Aguirre, E.**, Gaveglio, V.L. Pasquaré, S.J. Light induce changes on the endocannabinoid system in rod outer segment. Simposio Internacional Fronteras en Biociencias 3. Buenos Aires, Argentina, septiembre 17-19, 2018.
- **Chamorro Aguirre, E.**, Gaveglio, V.L., Giusto, N.M., Pasquaré, S.J. Diacylglycerol lipase activity in rod outer segments depends on the illumination state of the retina. Reunión Conjunta de Sociedades de

Biociencias. Buenos Aires, Argentina, noviembre 13-17, 2017. *Medicina* 2017, vol. 77 (Suppl. 1): pag. 302.

- **Chamorro Aguirre, E.,** Gaveglio, V.L., Giusto, N.M., Pasquaré, S.J. Endocannabinoid metabolism in rod outer segments depends on the illumination state of the retina. LII Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. Córdoba, Argentina, Noviembre 7-10, 2016. *Biocell* 2016, vol. 40 (Suppl. 1): pag. 108.

ABREVIATURAS

[³ H] DAG	[³ H] diacilglicerol
[³ H] MAG	[³ H] monoacilglicerol
[³ H] PC	[2- ³ H] fosfatidilcolina
[³ H] TAG	[2- ³ H] triacilglicerol
1-[9,10- ³ H]oleoil-LPA	1-[9,10- ³ H]oleoil-lisofosfatidato
12-LOX	12-lipooxigenasa
2-AG	2-araquidonoilglicerol
2-araquidonoil-LPA	2-araquidonoil lisofosfatidato
A	Acetona
ABDH12	Serina hidrolasa con dominio α/β 12
ABDH6	Serina hidrolasa con dominio α/β 6
AC	Adenilil ciclasa
Ac.Ac	Ácido acético
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEA	Anandamida
AGL	Ácidos grasos libres
AM251	N-(Piperidina-1-il)-5-(4-iodofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1 <i>H</i> -pirazol-3-carboxamida
AM630	6-Iodo-2-metil-1-[2-(4-morfolinil)etil]-1 <i>H</i> -indolil-3-](4-metoxifenil)metanona
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ANOVA	Ánalysis de varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
bis-MSD	1,4-bis(2-metilestiril)benceno
BSA	Albúmina sérica bovina
C	Cloroformo
CB1	Receptor cannabinoide 1

GMP	Guanosin monofosfato
GMP _c	Guanosin monofosfato cíclico
GPCR	Receptores acoplados a proteína G
GPR55	Receptor acoplado a proteína G 55
GTP	Guanosin trifosfato
GTPasa	Guanosin trifosfatasa
GTP γ S	Guanosín 5' [γ -tio] trifosfato
G β 5	Subunidad beta de la proteína G tipo 5
H	Hexano
H ₂ O	Agua
HRP	Peroxidasa de rábano
HU-308	(1S,4S,5S)-4-[4-(1,1-Dimetilheptil)-2,6-dimetoxifenil]-6,6-dimetilbiciclo[3.1.1]hept-2-eno-2-metanol
INL	Capa nuclear interna
IP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
IPL	Capa plexiforme interna
JNK	Jun quinasa
JWH-133, JWH	(6ar,10ar)-3-(1,1-dimetilbutil)-6a,7,10,10a-tetrahidro-6,6,9-trimetil-6H-dibenzo[b,d]pirano
kDa	Kilodalton
LGP	Lisofosfatidilglucósido
liso-PLC	Lisofosfolipasa C
LPA	Lisofosfatidato
LPAP	Lisofosfatidato fosfohidrolasa
LPC	Lisofosfatidilcolina
LPP	Lípido fosfato fosfatasas
M	Metanol
MAG	Monoacilglicerol
MAGL	Monoacilglicerol lipasa
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos

mGluR6	Receptor de glutamato metabotrópico 6
MOPS	3-(N-morfolino) ácido propanosulfónico
N ₂	Nitrógeno
NAPE	N-araquidonoil-fosfatidiletanolamina
NAPE-PLD	N-araquidonoil-fosfatidiletanolamina fosfolipasa D
NCKX1	Intercambiador de iones, Na ⁺ , Ca ²⁺ y K ⁺
NEM	N-etilmaleimida
OPL	Capa plexiforme externa
P	2-propanol
p / p	Peso / peso
p / v	Peso / volumen
PA	Ácido fosfatídico
PC	Fosfatidilcolina
PDE	Fosfodiesterasa 6
PDEαβ	Subunidades alfa, beta de la PDE
PDEαβ2γ	Subunidades alfa, beta y gamma de la PDE
PE	Fosfatidiletanolamina
PEMT	Fosfatidiletanolamina N-metil transferasa
PI	Fosfatidilinositol
PI sintasa	Fosfatidilinositol sintasa
PI3K	Fosfoinosítido-3-quinasa
PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PLA1	Fosfolipasa A1
PLA2	Fosfolipasa A2
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoruro
PPAR	Receptores activados por factores de proliferación peroxisomal
PPO	2,5-difeniloxazol

PS	Fosfatidilserina
PVDF	Polivinilidenofluoruro
R*	Rodopsina activada
R9AP	Proteína de unión a RGS9-1
RGCL	Capa de células ganglionares retinales
RGS9	Complejo de proteínas reguladoras de la señalización de la proteína G
RGS9-1	RGS9 de retina
RhoA	Miembro de la familia Rho GTPasas
RIS	Segmento interno
RK	Rodopsina quinasa
ROCK	Proteína quinasa asociada a Rho
ROS	Segmento externo de los bastones de retinas
ROS B	Segmentos externos de bastones expuestos a luz
ROS L	Segmentos externos de bastones provenientes de retinas expuestas a luz
ROS O	Segmentos externos de bastones provenientes de retinas mantenidos en oscuridad
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
SEC	Sistema endocannabinoide
SNC	Sistema nervioso central
SR141716, SR1	(N-(Piperidin-1-il)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamida)
SR144528, SR2	(N-[(1S)-endo-1,3,3-trimetilbiciclo[2.2.1]heptan-2-il]-5-(4-cloro-3-metilfenil)-1-[(4-metilfenil)metil]-1H-pirazol-3-carboxamida)
TBARS	Sustancias reactivas a ácido Tiobarbitúrico
THC	Δ^9 -tetrahidrocannabinol

TLC	Cromatografía en capa fina
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
Tritón X-100	Éter mono[p-(1, 1, 3, 3-tetrametilbutil) fenílico] del polietilenglicol
TRP	Receptores de potencial transitorio
TRPV1	Receptor de potencial transitorio vanilloide tipo 1
TS	Terminal sináptico
Tween	Polioxietileno sorbitan monolaurato
T α	Subunidad alfa de la transducina
T $\alpha\beta\gamma$	Transducina en su estado heterotrimérico
T $\beta\gamma$	Subunidades beta y gamma de la transducina
URB597	(3'-(aminocarbonil)[1,1'-bifenil]-3-il)-ciclohexilcarbamato
v/v	Volumen/volumen
WB	<i>Western blot</i>
WIN 55,212-1/ WIN	(R)-(+)-[2,3-Dihidro-5-metil-3-(4-morfolinilmetil)pirrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-6-yl]-1-naftalenilmetanona mesilato