



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

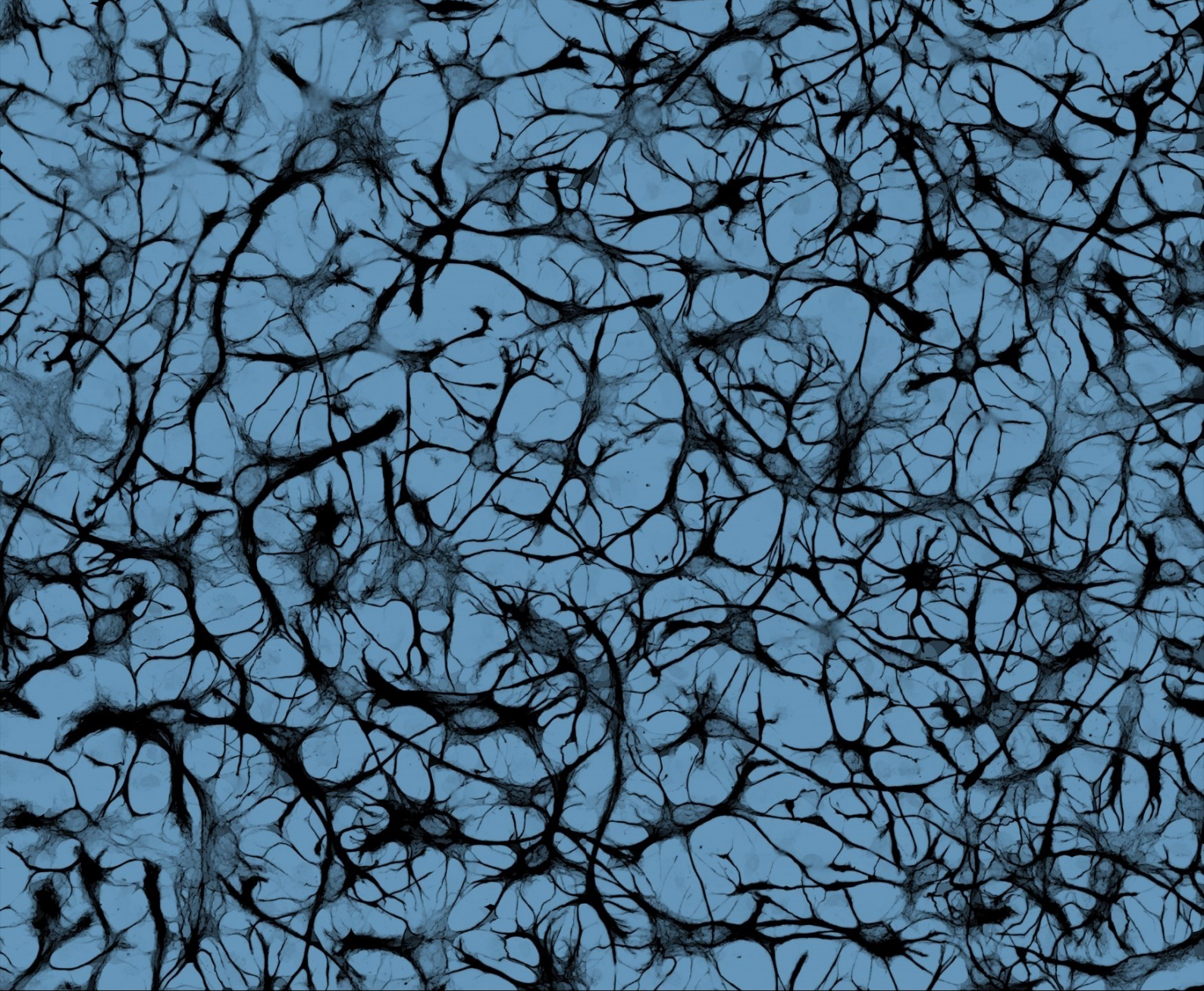
Expresión y Funcionalidad de Receptores de Cannabinoides y de Adenosina y de sus Heterómeros en modelos de Alzheimer y de Esclerosis Múltiple

Catalina Pérez Olives

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Expresión y Funcionalidad de Receptores de Cannabinoides y de Adenosina y de sus Heterómeros en modelos de Alzheimer y de Esclerosis Múltiple

Catalina Pérez Olives



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE BIOLOGIA
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOMEDICINA MOLECULAR

*Expresión y Funcionalidad de Receptores de Cannabinoides y de
Adenosina y de sus Heterómeros en modelos de Alzheimer y de Esclerosis
Múltiple*

Memoria presentada por la graduada en Biología
Catalina Pérez Olives
para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona

Esta tesis se ha inscrito dentro del Programa de Doctorado en Biomedicina

El trabajo experimental y la redacción de la presente memoria han sido realizados por
Catalina Pérez Olives bajo la dirección del Dr. Rafael Franco Fernández y la Dra.
Gemma Navarro Brugal

Dr. Rafael Franco Fernández
Director y tutor

Dra. Gemma Navarro Brugal
Directora

Catalina Pérez Olives

Barcelona, septiembre de 2023

ABSTRACT

Adenosine and endocannabinoids are regulatory molecules that are present in all organ and physiological systems. They act via specific receptors belonging to the G protein-coupled receptor (GPCR) superfamily. There are four adenosine receptors, A₁, A_{2A}, A_{2B} and A₃, that, in the central nervous system, are expressed in both neurons and glia. There are two cannabinoid receptors, CB₁ that is much more expressed in neurons than in glia, and CB₂ that is mainly expressed in glia. GPCR may form receptor-receptor complexes, both homo and heteromers, with specific properties. The aim of this PhD was to get insight into the potential of cannabinoid, of adenosine receptors and of their heteromers to become targets of Alzheimer's disease and of multiple sclerosis. Both expression and functionality of some receptors and of some receptor heteromers were addressed. In addition, a novel technique aimed at assessing the percentage of receptors that are forming heteromers was used to demonstrate, in a heterologous system, a differential effect of adenosine and caffeine on the expression of A₁R, A_{2A}R and A₁-A_{2A} receptor heteromers on the cell surface. The technique also allowed to show increased heteromer expression in primary cultures of activated astroglial cells (versus resting cells). Astroglia showed expression of the A₁-CB₁ receptor heteromer whose functionality was characterized by a negative crosstalk and a crossantagonism; crossantagonism due to the A₁-CB₁ receptor heteromer was also found in primary cortical neurons.

Finally, the heteromer formed by CB₁R and the N-methyl-D-aspartate ionotropic glutamate receptor (NMDAR) was identified and characterized in both heterologous systems and primary neurons. The results showed that CB₁R activation blocks NMDAR function and crossantagonism is detected. Increased expression of the CB₁R-NMDAR heteromer in primary cortical neurons treated with β -amyloid peptide suggests that targeting the heteromer may provide benefits in combating the detrimental effect of amyloid aggregation.

A Gabriel

AGRADECIMIENTOS

Parece mentira que haya llegado este momento. Estoy aquí sentada, nerviosa por escribir estas palabras, como si fueran las primeras que he escrito. Tengo una presión rara en el pecho y estoy a punto de llorar. Pero no lo haré, aún no. Y aunque sea mi especialidad, voy a intentar no enrollarme agradeciendo a la gente que me ha acompañado y apoyado durante esta etapa.

En primer lugar, a quién más se las merece, a mi familia, gracias. Francisco y Catalina, gracias por ser cómo sois y haberme enseñado a ser como soy. Gracias por darme las oportunidades, las lecciones, el criterio y la independencia. Gracias por escucharme y aconsejarme. Habéis sido, sois y seréis siempre mi referente. Como decía la abuela, mitad mañica mitad roqueta, y es que, es la verdad, he sacado lo bueno -y lo malo- de los dos lados. Y muy orgullosa de que así sea. Pilar, Pilarín, gracias, gracias y mil gracias. Quiero que sepas y que des por hecho que siempre estaré ahí para ti, como sé que tú lo estás para mí. Que puede que no seamos las hermanas más cuerdas, pero si no he perdido la cabeza del todo es porque sé que nunca estaré sola.

De nuevo, familia, gracias. Os quiero.

A mis compañeros de laboratorio, gracias. Habéis sido mi primera familia científica, y no podré olvidaros jamás. Rafa, el cordobés de Jaén, mi primer maestro en el laboratorio. Cometiste el gran error de enseñarme y permitirme hacerte una “preguntita técnica”, condenándote a aguantarme durante estos cinco años y pico. Pronto iremos a por otra milanesa. Gracias por tu apoyo moral y científico. Espero llevarme un poco de tu magia conmigo, para ser algún día tan buena científica como lo eres tú. Y tal vez, ¿quién sabe?, tal vez algún día la vida sea más dura que la verdura. Jaume, Jaime ¿sabes? No sé por dónde empezar. Tengo claro desde el primer día que llegué al lab, que eres alguien muy único, irradias una energía que poca gente tiene, y estoy agradecida de haberla disfrutado este tiempo. Sigo creyendo, pero, que no puedes matar un macaco a golpes. Pero estoy segura de que alcanzarás grandes metas, con tu energía y tu impulsividad. Te seguiré mandando memes. Alejandro, eres una de las personas más bellas con las que he tenido el placer de trabajar. Tienes un imán gigante en el pecho (y no por los pecs) que atrae a la gente hacia tu cálida personalidad. Gracias por estar siempre dispuesto a ayudarme. Sin duda van a tener mucha suerte de tenerte en Hawái, o en el país de playas de ensueño en el que acabes. Iu, una I y una U, que se acaba esto ya, eres el siguiente. Me alegra mucho, y te agradezco aún más, que hayas sido mi compañero de camino estos últimos años, avanzando paso a paso en paralelo. Eres ambicioso y muy capaz, Iu, no dejes que nadie, ni tú mismo, te diga lo contrario. Me llevo conmigo el “compartir és viure i viure és estimar” y lo expandiré allá donde vaya. Joan Biel, sé que soy pesada con lo mucho que os insisto en limpiar y no meter ruido. Pero eso no significa que no aprecie y agradezca vuestro humor interminable, y vuestras bromas horribles, que tarde o temprano me hacen llorar de la risa. Irene ¿cómo te agradezco yo, Irene? Si es que eres la otra mitad de radio-patio. Muchas gracias, de verdad. Por ser ese apoyo que tanto necesitaba, y por entenderme tantas y tantas veces. Quiero dejar muy claro que vales oro, Irene, y que siempre que necesites que alguien te lo recuerde, yo estaré más que dispuesta. A todos, gracias.

También agradecer a los TFG, los TFM y los erasmus que han pasado por el laboratorio. Que me han enseñado a enseñar y lo mucho que me gusta. Algunos han sido fugaces y otros se han quedado para convertirse en grandes amistades, como Nerea. Flor, gracias por ser cómo sólo tú puedes y por apoyarme estos años. Y a los nuevos integrantes, Claudia y Toni, buena suerte, disfrutad de esta nueva etapa. También quiero agradecerle a Dasiel por mis días en

Estocolmo. Gracias por acogerme y por valorarme, de verdad. Y a Gabriel y a Alba, gracias por hacer de la estancia una experiencia tan estupenda. Linde, I want to thank you as well, for our little library sessions and for teaching me Flemish. I promise I will not burn any church. Gracias también a la gente de los departamentos, que siempre está dispuesta a echar una mano. Toni y los de la secrete. A los profes con quién he compartido tantas horas de prácticas. A Christopher por las mil y una preguntas que le hago, y a Ignasi por las charlas infinitas sobre lo bonita que es Menorca. Y a los Jimmys, que no se me olvidan los Jimmys, gracias.

Y, por supuesto, a mis directores de tesis, a Rafa y a Gemma, gracias por todo lo que me habéis enseñado estos años.

También tengo mucha gente a la que agradecer su apoyo incondicional fuera del laboratorio. Gente que me ha acompañado en esta etapa de mi vida, que me ha visto llorar de felicidad y reír de frustración. Gente que hace que me sienta tan afortunada. Los que se merecen, al igual que mi familia, varias páginas de agradecimientos cada uno. Lo siento, os tendréis que conformar con cuatro palabras.

A las valientes que se fueron a vivir conmigo a una ciudad nueva hace 9 años ya. Marina y Estefi, a las que pronto se sumó Laia. Gracias por haberme permitido madurar con vosotras. Por ser tan fuertes. Gracias por inspirarme en tantos aspectos personales, artísticos e incluso musicales, y gracias por seguir siendo, aunque no vivamos juntas, mis compañeras, mis amigas. También gracias a Atticus Juan que con Nietzsche se han convertido en mis peludos más queridos. Pero no solo he tenido la suerte de compartir mi “otro hogar” con ellas: Alicia, gracias por estar siempre lista para echarnos una risa y adivinar canciones y alturas de famosos al azar. Gracias también a Dani, siempre charming nunca un-charming, dispuesto a buscar durante horas la canción residente en mi cerebro. Gracias también a Juan Marc (Xuan Marc), tu fisio-osteópata-nutricionista de confianza y el máximo consumidor de Sobrasada. Déu vos guard. Y al final de la larga lista de compañeros de piso, pero no por falta de relevancia, me dejo a mi hermana de otra madre, a quien con siempre puedo contar. Meri, gracias, gracias por ser la roca que necesita esta roca. Por consolarme cuando lo necesito, por obligarme a subir montañas, y por pararte a ver las vistas conmigo.

Lourdes, gracias por las eternas charlas, espero que estés tan orgullosa de mi como yo de ti cada vez que te veo actuar, llorando, porque soy así. Carlos, Cal·los, gracias por los paseos de filosofía interna, y por el cortijo lleno de animales con grandes problemas de identidad. Es imposible aburrirse contigo. A Mireia, gracias por ser mi eterna fuente de referencias, y por siempre estar dispuesta a intercambiar unos buenos podcast mañaneros. A David, gracias por el aterrizaje suavizado a base de kilómetros (y kilómetros) de calma y cafés bohemios. A Coral, Coralina, gracias por estar ahí para animarme, por estar siempre dispuesta.

A mi más larga amistad, de esas que son para toda la vida, gracias, Marta, por hacerme sentir como que no pasa el tiempo cada vez que nos vemos. Y, Roc, peque, ya puedes portarte bien y cuidar de tu madre. Laura y María, mis armas, mis pilindolas. Gracias por escucharme sin juzgar, por apoyarme sin límites y por estar siempre ahí para mí. Del mismo modo que lo estaré yo para vosotras. Da igual lo lejos que estemos, que nuestros caminos siempre avanzan en paralelo. 4·8·16. A María, la casá, gracias también, por confiar en mí en tus momentos duros, y por entenderme en los míos. Y a la última María (de Padura), gracias por esta amistad tan rica, sin prejuicios, llena de valoración personal y de delulu. Un gran gracias también a los Bangs, especialmente a Blanca, por dejarme arrastrarte y por arrastrarme tú a tantas aventurillas. Siento la brevedad, pero espero haberos transmitido mi gratitud.

-Gracias por esta etapa, nos vemos en la siguiente-

ÍNDICE

1.INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Receptores acoplados a proteína G	1
1.1.1. Estructura y clasificación de los GPCR.....	1
1.1.2. Transducción de señal a través de GPCR	3
1.1.3. Selectividad funcional	6
1.1.4. Oligomerización de receptores	6
1.2. Sistema adenosinérgico.....	11
1.2.1. Receptores de adenosina.....	13
1.3. Sistema endocannabinoide	19
1.3.1. Los Compuestos cannabinoides.....	22
1.3.2. Receptor de cannabinoides 1 (CB ₁ R)	25
1.4. Esclerosis múltiple	28
1.4.1. Epidemiología y diagnóstico de la Esclerosis Múltiple	31
1.4.2. El rol de la astrogliá en la Esclerosis Múltiple	33
1.4.3. Implicaciones de los receptores de adenosina en la Esclerosis Múltiple	35
1.4.4. Implicaciones de los receptores de cannabinoides en la Esclerosis Múltiple	36
1.5. La enfermedad de Alzheimer	37
1.5.1. Epidemiología y diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer	40
1.5.2. Implicaciones de los receptores de adenosina en la enfermedad de Alzheimer ...	42
1.5.3. Receptor de N-metil-D-aspartato (NMDAR)	43
2.OBJETIVOS	49
3.METODOLOGÍA.....	52
3.1. Reactivos y líneas celulares.....	53
3.1.1. Producción de oligómeros A β	53
3.2. Cultivo celular y expresión heteróloga.....	53
3.2.1. Proteínas de fusión y vectores de expresión	54
3.2.2. Obtención de cultivos primarios de neuronas	54
3.3. Modelos animales	55
3.3.1. Ratón modelo de esclerosis múltiple.....	55
3.4. Ensayo inmunocitoquímico	56
3.4.1. Colocalización de receptores	56
3.4.2. Detección de GFAP.....	56
3.5. Transferencia de energía resonante bioluminiscente (BRET)	57

3.5.1. Ensayo de reclutamiento de β -Arrestina II	57
3.6. Determinación de la acumulación de AMPc intracelular	58
3.7. Determinación de la fosforilación de MAPK	59
3.7.1. Determinación de la fosforilación de ERK1/2 mediante <i>western blot</i> (WB)	59
3.7.2. Determinación de la fosforilación de ERK1/2 mediante inmunoensayo	60
3.8. Ensayos de liberación de calcio	61
3.9. Ensayos de ligación por proximidad (PLA)	62
3.9.1. <i>NaveniTMTriFlex Cell MR</i>	64
3.10. Análisis estadístico	65
4.RESULTADOS	69
4.1. El complejo heteromérico A ₁ R-CB ₁ R como posible nueva diana terapéutica para la Esclerosis Múltiple	69
4.1.1. Los receptores de adenosina A ₁ y de cannabinoides CB ₁ forman complejos heteroméricos en células HEK-293T transfectadas	69
4.1.2. El complejo heteromérico A ₁ R-CB ₁ R presenta un fenómeno de crosstalk negativo en células HEK-293T transfectadas	70
4.1.3. El complejo heteromérico A ₁ R-CB ₁ R se expresa en cultivos primarios de neuronas corticales	71
4.1.4. La expresión del complejo heteromérico A ₁ R-CB ₁ R se ve incrementada en astrocitos activados	73
4.1.5. La expresión del complejo A ₁ R-CB ₁ R incrementa en el área cortical de ratones tratados con cuprizona	75
4.2. Implicaciones del heterómero A ₁ R-A _{2A} R en la Esclerosis múltiple	76
4.2.1. La activación del A _{2A} R bloquea la señalización del A ₁ R en la vía del AMPc en células CHO transfectadas	76
4.2.2. La expresión de A ₁ R, A _{2A} R y el complejo A ₁ R-A _{2A} R disminuye bajo el tratamiento con adenosina	78
4.2.3. La expresión del complejo A ₁ R-A _{2A} R aumenta en astrocitos activados	79
4.2.4. El tratamiento con el agonista de A ₁ R aumenta la inmunoreactividad de GFAP en astrocitos activados	80
4.2.5. Caracterización de la funcionalidad del heterómero A ₁ R-A _{2A} R en cultivos primarios de astrocitos	82
4.2.6. La expresión del complejo A ₁ R-A _{2A} R aumenta en el área cortical de ratones tratados con cuprizona	84
4.3. Expresión del heterómero de los receptores de adenosina A _{2A} -A ₃ en diferentes regiones cerebrales	85
4.3.1. Expresión diferencial del heterómero A _{2A} R-A ₃ R en cultivos primarios de neuronas de corteza, estriado e hipocampo	85
4.3.2. Caracterización de la funcionalidad del heterómero A _{2A} R-A ₃ R en cultivos primarios de neuronas corticales, estriales e hipocámpales	85
4.4. El complejo heteromérico NMDAR-CB ₁ R como posible diana terapéutica en la Enfermedad de Alzheimer	87

4.4.1. En el heterómero CB ₁ R-NMDAR, la activación de CB ₁ R bloquea la señalización dependiente de NMDAR en células HEK-293T transfectadas	87
4.4.2. La activación de NMDAR bloquea la señalización de CB ₁ R en cultivos primarios de neuronas de corteza.....	89
5.RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	95
6.CONCLUSIONES	106
7.BIBLIOGRAFÍA.....	111

ABREVIATURAS

2-AG	2-araquidonoiletanolamida	BRET	Transferencia de energía resonante bioluminiscente
5-HTR	Receptor de serotonina	BSA	Albúmina sérica bovina
5'-NT	5-nucleotidasa	Ca ²⁺	Catión calcio
AA	Ácido araquidónico	CAFFE	Cafeína
AC	Adenilato ciclasa	CBD	Cannabidiol
ACEA	Araquidonil-2'-cloroetilamida	CBDV	Cannabidivarina
ADA	Adenosina-desaminasa	CBGA	Ácido cannabigerólico
ADK	Adenosina-quinasa	CBGVA	Ácido cannabigerovarínico
ADNc	ADN complementario	CBN	Cannabinol
ADP	Adenosín difosfato	CBR	Receptor de cannabinoides
ADO	Adenosina	CCA	Caso clínico aislado
AEA	Anandamida	CCL2	Ligando 2 de quimiocina
AEM	Agencia europea del medicamento	COX-2	Ciclooxigenasa 2
AMP	Adenosín monofosfato	CPA	N ⁶ -Ciclopentiladenosina
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico	CPZ	Cuprizona
APP	Proteína precursora amiloide	CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc
AR	Receptor de adenosina	CT	Tomografía computarizada
ATP	Adenosín trifosfato	C-term	Dominio carboxilo-terminal
Aβ	Péptido β-amiloide	DAG	Diacilglicerol
BAFF	Factor activador de células B	DAGL	Diacilglicerol lipasa
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro	DMF	Fumarato de Dimetilo
BE	Bucles extracelulares	DMT	Terapias de modificación de la enfermedad
BHE	Barrera hematoencefálica	DR	Receptor de dopamina
BI	Bucles intracelulares	EA	Enfermedad de Alzheimer
BiFC	Complementación de fluorescencia bimolecular	EAE	Encefalomiелitis autoinmune

eCB	Endocannabinoides	HTRF	Transferencia de energía resonante fluorescente homogénea resuelta en el tiempo
EH	Enfermedad de Huntington	ICAM	Molécula de adhesión intercelular
EM	Esclerosis múltiple	iGluR	Receptor ionotrópico de glutamato
EMPP	Esclerosis múltiple progresiva primaria	IL	Interleucina
EMPS	Esclerosis múltiple progresiva secundaria	INO	Inosina
EMRR	Esclerosis múltiple recurrente remitente	IP ₃	Inositol trifosfato
EP	Enfermedad de Parkinson	JNK	Quinasas del extremo N-term de C-Jun
ER α	Receptor de estrógenos α	KLCR	Cadenas ligeras libres de Kappa en el LCR
ETA	Etanol amida	KO	<i>Knock out</i>
Eu	Europio	LCR	Líquido cefalorraquídeo
FAAH	Amida-hidrolasa de ácidos grasos	L-DOPA	Levodopa
FBS	Suero fetal bovino	LPS	Lipopolisacárido
fCB	Fitocannabinoides	LTP	Potenciación a largo plazo
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de EEUU	MAGL	Monoacilglicerol lipasa
FK	Forskolina	MAPK	Proteína-quinasa activada por mitógenos
FRET	Transferencia de energía resonante fluorescente	mBU	Mili unidades de BRET
CBGVA	Cannabigerovarina ácida	Mg ²⁺	Catión magnesio
GFAP	Proteína fibrilar acídica de la glía	mGluR	Receptor metabotrópico de glutamato
GFP	Proteína fluorescente verde	MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
GluR	Receptor de glutamato	miRNA	MicroARN
GPCR	Receptor acoplado a proteína G	MRI	Imagen por resonancia magnética
GRK	Quinasas de receptores acoplados a proteína G	mRNA	ARN mensajero
Gro	Glicerol	MRS	Espectroscopia de resonancia magnética
GTPasa	Guanosina trifosfatasa		
HFIP	1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol		

NaCl	Cloruro sódico	Treg	Linfocito T regulador
NAM	Modulador alostérico negativo	TRPV1	Receptor de potencial transitorio vaniloide 1
NAPE	N-acil-fosfatidiletanolamina	UV	Ultravioleta
NAPE-PLD	N-acil-fosfatidiletanolamina fosfolipasa D	VCAM	Molécula de adhesión vascular
NMDAR	Receptor de N-metil-aspartato	Vit-D	Vitamina D
N-term	Dominio amino-terminal	WB	Western blot
ONF	Ovillos neurofibrilares	WNT	<i>Wingless/integrated</i>
PAM	Modulador alostérico positivo	YFP	Proteína fluorescente amarilla
PBS	Tampón fosfato salino	β -AR	Receptor β -adrenérgico
PEI	Polietilenimina	Δ^8 -THC	Δ^8 -Tetrahidrocannabinol
PET	Tomografía de emisión positrónica	Δ^9 -THC	Δ^9 -Tetrahidrocannabinol
PFA	Paraformaldehído		
PiP ₂	Fosfatidilinositol bifosfato		
PKA	Proteína quinasa A		
PLA	Ensayo de ligación por proximidad		
PLC	Fosfolipasa C		
PPAR	Receptores activados por proliferadores peroxisomales		
Rluc	Renilla Luciferasa		
R-PIA	(-)-N ⁶ -(2-Fenilisopropil)-adenosina		
RT	Temperatura ambiente		
SEC	Sistema endocannabinoide		
SNC	Sistema nervioso central		
TGF	Factor de crecimiento transformante		
THCV	Tetrahidrocannabivarina		
TM	Dominio transmembrana		
TNF	Factor necrótico tumoral		

A microscopic image of neurons, showing their cell bodies (soma) and branching processes (dendrites and axons) against a solid blue background. The neurons are dark, almost black, and their branching patterns are complex and interconnected.

INTRODUCCIÓN

1.INTRODUCCIÓN

1.1. Receptores acoplados a proteína G

La membrana plasmática de las células eucariotas desempeña, entre otras, la función de regular la entrada y salida de moléculas e información a la misma. Aproximadamente la mitad de su peso total corresponde a proteínas asociadas a membrana (Cooper, 2000). Entre ellas cabe destacar el papel de las proteínas transmembrana, la cuales se caracterizan por atravesar completamente la bicapa lipídica. En humanos se conoce que cerca de entre un 5% y un 10% de los genes codifican para los componentes de una superfamilia concreta de estas proteínas transmembrana conocida como receptores acoplados a proteína G o GPCR, por sus siglas en inglés (Venter et al., 2001).

1.1.1. Estructura y clasificación de los GPCR

Los GPCR son una de las superfamilias más extensas de receptores de membrana en células eucariotas, aproximándose a los 800 receptores descritos en humanos. Conservan estructuralmente siete dominios transmembrana (TM) en α -hélice (Zhou et al., 2019), conectados por una serie de bucles extracelulares (EL) e intracelulares (IL). Así mismo, presentan un dominio amino-terminal (N-term) extracelular y un dominio carboxilo-terminal (C-term) citosólico (Figura 1).

Los GPCR son capaces de mediar gran variedad de procesos fisiológicos, por lo que resultan de gran interés como dianas terapéuticas en múltiples patologías. Aproximadamente, un centenar de GPCR son dianas para el 34% de los fármacos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EEUU (FDA) (Hauser et al., 2018). De hecho, según los estudios más recientes en el tema, aproximadamente el 36% de las moléculas en ensayos clínicos en desarrollo actúan en GPCR no descritos como diana de medicamentos ya aprobados. (Hauser, Attwood, Rask-Andersen, Schiöth, & Gloriam, 2017). Una de las bases de su diversidad funcional se encuentra en la variabilidad de sus secuencias, que caracterizan los lugares de unión a agonista y las regiones de unión a proteína G (Zhou et al., 2019).

El estudio estructural de los receptores acoplados a proteína G avanzó de manera significativa con la cristalización del primer GPCR, el receptor bovino de rodopsina (Palczewski et al., 2000), el cual se consiguió cristalizar en complejo con la molécula retinal. No fue hasta ocho años más tarde, que pudo obtenerse el cristal libre de ligando (Scheerer et al., 2008). En las últimas décadas, los avances en técnicas como la criomicroscopía electrónica o el aumento de la relevancia del análisis *in silico* han permitido un nuevo enfoque en el estudio de la estructura de los GPCR, siendo el principio del diseño de fármacos basado en la estructura, herramienta rápida y eficiente, que está sustituyendo modelos más clásicos usados en la industria farmacéutica.

Dada la gran cantidad y variedad de GPCR no es extraño que exista más de un sistema de clasificación de estos receptores. Las dos clasificaciones más aceptadas son la propuesta por Kolakowski (Kolakowski, 1994), que agrupa hasta 6 clases distintas de GPCR según su homología de secuencia, incluyendo incluso receptores no presentes en vertebrados. Y, la segunda, propuesta desde el estudio filogenético de los receptores por Schiöth y Fredriksson (Schiöth & Fredriksson, 2005), que tan solo considera los receptores propios de vertebrados. Según esta última, hay cinco familias de GPCR:

Familia de la rodopsina (Clase A): consta del mayor número de receptores conocidos. En el caso de humanos, cerca de 700 receptores descritos. Los receptores pertenecientes a esta familia presentan una estructura similar a la del receptor de rodopsina, con ciertas zonas altamente conservadas como las regiones NSxxNPxxY en el TM7 o la región DRY en el TM3. Otra característica general de esta familia, que no cumplen todos sus integrantes, es su corto dominio amino-terminal, y el hecho de que éste no es crucial para la unión a ligando, dado que su centro ortostérico se encuentra en una cavidad formada por los propios dominios transmembrana.

Familia de la secretina (Clase B1): como su propio nombre indica, en esta familia se incluyen los receptores de estructura y secuencia similar a la del receptor de secretina, así como de glucagón. Sus miembros se caracterizan por presentar un dominio amino-terminal relativamente largo, de unos 100 aminoácidos, que contiene regiones conservadas ricas en cisteínas. En esta familia el extremo amino-terminal es un elemento crucial para la unión de ligando. Gran parte de sus integrantes se caracterizan por unir ligandos peptídicos, que cumplen, habitualmente, con funciones paracrinas a nivel tisular.

Familia de metabotrópicos de glutamato (Clase C): en esta familia se agrupan los receptores metabotrópicos de glutamato (1-8) y los de similar estructura, como son los receptores GABA_B. Se caracterizan por un extremo amino-terminal muy extenso, que presenta dos lóbulos diferenciados separados por una cavidad a la que se une el ligando.

Familia de adhesión (Clase B2): en esta se incluyen receptores con largos extremos amino-terminal que presentan dominios de unión al factor de crecimiento epidérmico (EGF). Así mismo, presentan en su dominio N-term gran número de residuos serina y treonina susceptibles a O- y N-glicosilación, y dominios descritos en otras proteínas como son las cadherinas, la lectina o la integrina. (Vizurraga et al., 2020)

Familia *Frizzled/Smoothed* (Clase E-F): es una familia con pocos receptores descritos hasta la fecha, cerca de una decena en humanos, que se caracterizan por unir ligandos derivados de la familia *wingless/integrated* (WNT) o por la acción derivada de las proteínas de la familia *Hedgehog*.

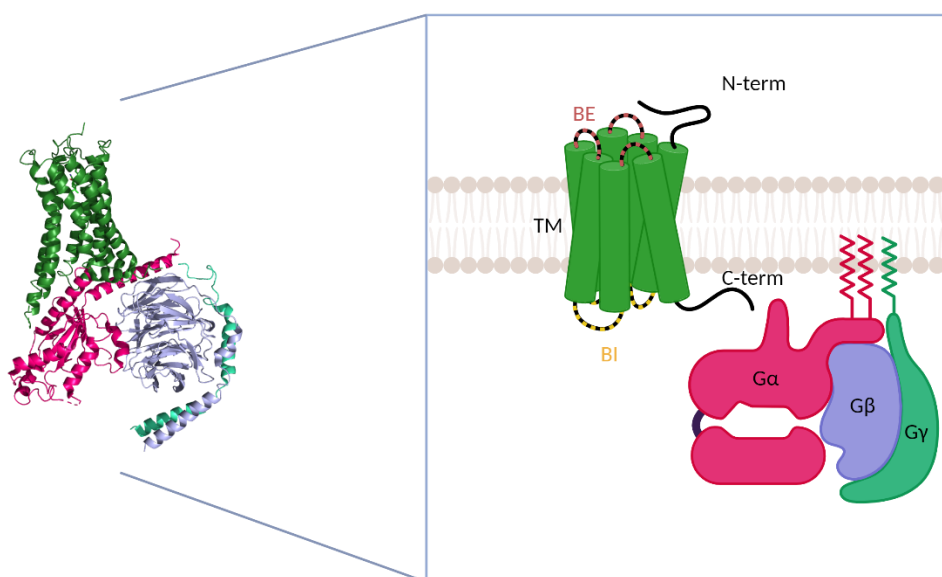


Figura 1. Representación esquemática de la estructura del receptor cannabinoide de tipo 2 (CB₂R) de la clase A de receptores acoplados a proteína G (GPCR). [Abreviaturas en figura: dominio amino-

terminal (N-term), bucles extracelular (BE), dominio transmembrana (TM), dominio carboxilo-terminal (C-term), bucles intracelular (BI)]

1.1.2. Transducción de señal a través de GPCR

El proceso de transducción de señal consiste en la activación de múltiples cascadas de señalización intracelular encargadas de modular la respuesta celular a un estímulo externo. Los receptores acoplados a proteína G presentan una plétora de agonistas y señales que son capaces de transducir al interior de la célula. Se han descrito GPCR capaces de unir, entre otros, compuestos lipídicos, aminos, nucleótidos, iones e incluso fotones o moléculas odorantes.

Los cambios conformacionales que derivan de la unión de ligando (agonista) endógeno, y por tanto que estabilizan lo que se conoce como la forma activa del receptor, han sido estudiados con profundidad. Actualmente se han descrito 988 estructuras distintas, siendo gran parte de estas de receptores pertenecientes a receptores de clase A. Los estudios llevados a cabo basados en las diferencias entre la forma activa, o en complejo con el ligando, y la forma inactiva, o libre de ligando, permiten dilucidar los cambios conformacionales que ocurren para el acoplamiento de la proteína G, y, por tanto, para la transducción de señal por parte del receptor (D. Zhang et al., 2015). Dentro de la diversidad observada, los cambios más destacados por su recurrencia son: la rotación del extremo intracelular del TM6 a una posición externa; la cual es seguida de una rotación externa del extremo del TM5 y el (D. Zhang et al., 2015) reposicionamiento hacia el interior del extremo del TM7 (Latorraca et al., 2017). Estos cambios conformacionales ocasionarán la aparición de una cavidad en la parte citosólica del receptor que permite el acoplamiento de la proteína G correspondiente. Por tanto, la unión de ligando conlleva un cambio conformacional mucho más abrupto en la parte intracelular del receptor, en comparación a la parte extracelular, donde se aprecia una sutil contracción del centro de unión al ligando (Hilger, 2021).

En resumen, el primer paso el proceso de transducción de señal consiste en la activación del receptor por parte la unión de un ligando, el cual estabilizará la conformación activa del receptor para su acoplamiento con la proteína G heterotrimérica.

Existen, dependiendo de su actividad, dos tipos de proteínas G descritas: las GTPasas pequeñas (S. Song et al., 2019), que actúan en forma monomérica, con actividad hidrolasa, ampliamente representadas por la superfamilia Ras. Y las proteínas G heterotriméricas, que necesitan la formación del complejo para realizar su función, siendo capaces de acoplarse a los GPCR. Estas últimas están constituidas por tres subunidades: α (G_α), β (G_β) y γ (G_γ). Las proteínas G heterotriméricas se clasifican en función de la similitud en las secuencias de sus subunidades G_α , así como de las vías que desencadenan con su activación. Las mejor descritas se clasifican en 4 familias (Figura 2):

$G_{\alpha s}$ con capacidad estimuladora de la enzima adenilato ciclasa (AC), encargada de la transformación del adenosín trifosfato (β) en adenosín monofosfato cíclico (AMPC), segundo mensajero que promueve la acción de la proteína quinasa A (PKA).

$G_{\alpha i}$ con función inhibidora de la AC, y con acción opuesta a la $G_{\alpha s}$, disminuye los niveles de AMPC intracelular (Villaseca et al., 2022).

$G_{\alpha q/11}$ con función activadora de la fosfolipasa C (PLC), enzima encargada de catalizar la hidrólisis del fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂) para la obtención del inositol trifosfato (IP₃)

y el diacilglicerol (DAG), segundos mensajeros claves en la regulación de la salida de calcio del retículo endoplasmático, entre otras funciones de señalización celular.

$G_{\alpha12/13}$ con función estimuladora de integrantes de la familia de las GTPasas Rho. Destacando la GTPasa Rho A, la cual regula gran número de procesos intracelulares (Suzuki et al., 2009).

El acoplamiento de la proteína G heterotrimérica al receptor se da cuando esta se halla en forma inactiva, es decir, unida al nucleósido difosfato GDP. El complejo formado entre el receptor y la proteína G confiere a este primero la función de proteína intercambiadora de guanina promoviendo así el intercambio de GDP por GTP en la subunidad G_{α} de la proteína G heterotrimérica. Este intercambio será el que cause la disociación del heterotrímero para que las subunidades resultantes puedan mediar diferentes cascadas de señalización. Las acciones derivadas de la actividad de la subunidad G_{α} han sido previamente explicadas. Finalmente, la proteína G volverá a su estado inactivo en el momento en que se hidrolice la GTP mediante la función GTPasa de la subunidad G_{α} . Permitiendo el reensamblaje del heterotrímero y la posibilidad de acoplarse a otro receptor.

Por lo que respecta al complejo $G_{\beta\gamma}$, al no presentar actividad catalítica, basan su acción en interacciones proteína-proteína (Smrcka, 2008). Entre otras, las vías de señalización dependientes de $G_{\beta\gamma}$ son la activación de proteína-quinasa activada por mitógenos (MAPK) (Naor, 2009), o la activación de vías de señalización dependientes de quinasas del extremo N-term de c-Jun (JNK) o p38.

Se conocen diversas cascadas dependientes de $G_{\beta\gamma}$ que resultan en la activación de las MAPK (S. M. Khan et al., 2013), pero cabe destacar la vía del reclutamiento de quinasas de receptores acoplados a proteína G (GRK). La acción de las GRK sobre el receptor favorece el reclutamiento de β -arrestinas, proteínas de andamiaje que actuaran como adaptadores para la acción de la familia de tirosina-quinasa Src (Gurevich & Gurevich, 2019). La acción de las β -arrestinas no es exclusiva en la transducción de señal de los GPCR, sino que también juega un papel crucial en el proceso de desensibilización.

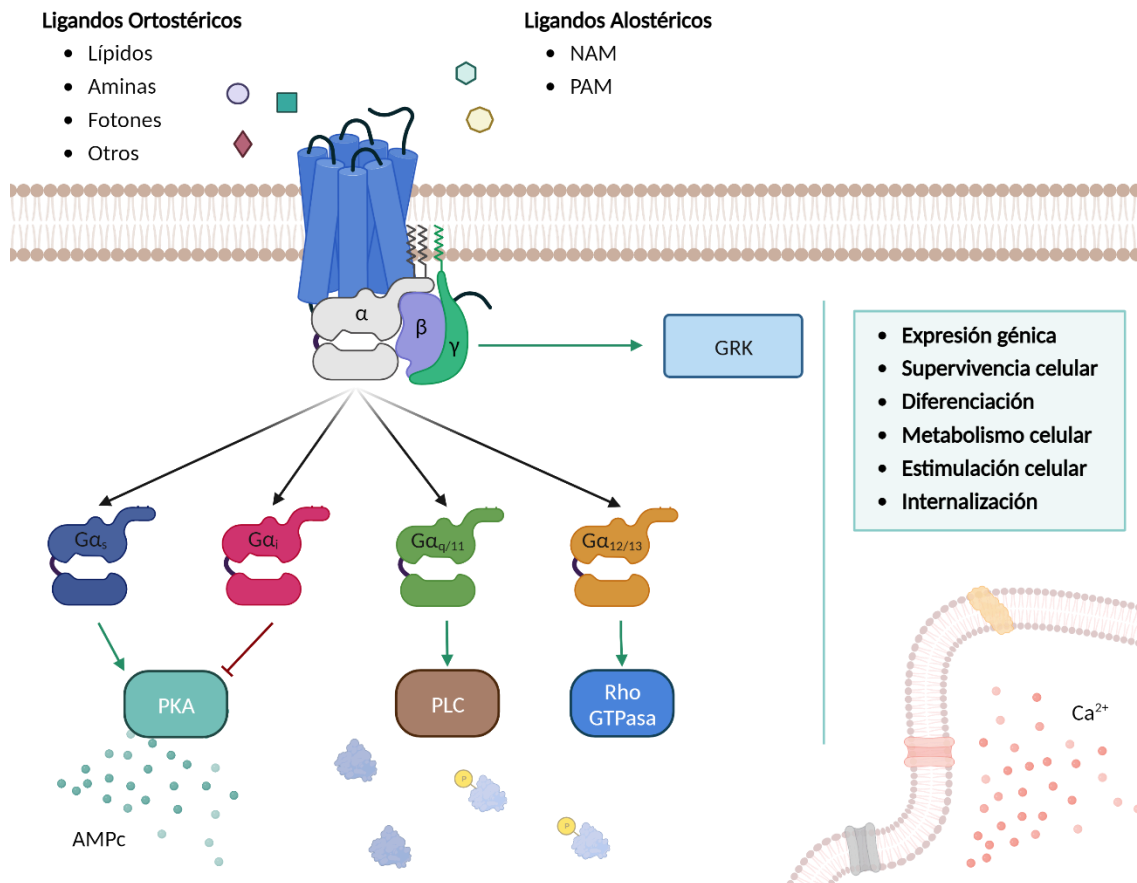


Figura 2. Señalización dependiente de la activación de GPCR y diversidad de ligandos ortostéricos y alostéricos. [Abreviaturas en figura: Modulador alostérico negativo (NAM), Modulador alostérico positivo (PAM), Quinasas de receptores acoplados a proteína (GRK), Proteína quinasa A (PKA), Adenosín monofosfato cíclico (AMPc), Fosfolipasa C (PLC), Cation calcio (Ca^{2+})]

Para dar lugar a la terminación de la señalización mediada por el receptor, evitando un disparo continuo de información que pueda comprometer la homeostasis celular, se inicia la desensibilización del receptor (Gainetdinov et al., 2004). Esta puede darse principalmente de dos maneras: regulando la cantidad de receptores a nivel de membrana plasmática o modificando la eficiencia de dichos receptores para unir a su ligando. En el primer caso, el mecanismo principal es mediante la internalización del receptor. Resultando en posibles modificaciones posteriores para su degradación en lisosomas, o bien su reciclaje para su subsiguiente translocación a la superficie membranal (resensibilización). En ambos casos, la internalización será posterior a la activación del receptor. También se han descrito casos en que los receptores no activados pueden ser internalizados para su posterior reciclaje. En el segundo caso, entre los mecanismos propuestos destacan las interacciones alostéricas, las cuales se basan en moléculas con la capacidad de modificar indirectamente el efecto de un agonista al unirse al receptor (Shen et al., 2023).

Si bien la visión clásica defiende una dicotomía conformacional de los GPCR representada por un estado activo, un estado donde el receptor se encuentra unido a ligando, y un estado inactivo. Se conocen múltiples estados conformacionales intermedios funcionalmente relevantes. Los GPCR son sistemas dinámicos, lo que resulta en una compleja regulación de multitud de funciones diversas.

1.1.3. Selectividad funcional

Farmacológicamente, el centro activo u ortostérico de un receptor es el lugar en el que el ligando endógeno es reconocido por el receptor. Así mismo, existen otros lugares de unión, conocidos como centros alostéricos, los cuales pueden unir moléculas capaces de modificar la afinidad o la eficacia con la que se unen los ligandos al centro ortostérico (Chan et al., 2019).

En función de la eficacia ejercida por la unión del ligando al receptor, podemos identificar diferentes tipos de ligandos:

Los agonistas son aquellas moléculas que al unirse al centro ortostérico son capaces de activar el receptor. Si la eficacia del agonista desencadena una respuesta máxima del receptor, este será descrito como agonista total. Mientras que, si la activación resulta en un efecto menor a la del agonista total aún en concentraciones saturantes, se trata de un agonista parcial. Un antagonista, así, será el ligando que se une al centro ortostérico del receptor bloqueando la entrada de un agonista, y evitando así, la acción derivada de su unión.

Gran número de receptores presentan una actividad basal o constitutiva, la cual se caracteriza por ser independiente de ligando. (Seifert & Wenzel-Seifert, 2002). Un agonista inverso es aquel que, al unirse, es capaz de bloquear esta actividad.

Hace décadas se introdujo el término de agonismo sesgado o *biased agonism*, que en la actualidad está tomando gran relevancia en el ámbito del diseño de medicamentos (Kenakin, 1995). Este concepto se basa en la capacidad de ciertos agonistas para activar un subconjunto de cascadas de señalización asociadas al receptor en cuestión de manera selectiva, es decir, activar unas vías en detrimento de otras. Propiedad con gran potencial farmacéutico, ya que puede suponer un aumento en la eficacia de los medicamentos, e incluso una disminución en los efectos adversos. (Gundry et al., 2017).

Como se ha introducido anteriormente, las moléculas capaces de unirse a los centros alostéricos no son capaces de activar *per se* la actividad del receptor, pero sí de modificar la actividad ejercida por la unión del ligando al centro ortostérico. Por lo que, a estas moléculas se las denomina moduladores alostéricos, los cuales pueden ser positivos (PAM) o negativos (NAM), en función de si su regulación favorece o no la transducción derivada de la activación del receptor (Lane et al., 2013).

1.1.4. Oligomerización de receptores

Las interacciones proteína-proteína suponen la base de un amplio abanico de procesos biológicos como son el ciclo celular, el desarrollo o la comunicación célula-célula. En la década de los 90, se planteó por primera vez la interacción entre GPCR descrita por los estudios de R. Lefkowitz donde se observó una cooperatividad negativa entre receptores β -adrenérgicos (β -AR) (Limbird, Meyts, & Lefkowitz, 1975). Estos estudios iniciaron una corriente en el estudio de los GPCR que conllevó a la demostración de la formación de oligómeros formados por más de un receptor (Rao et al., 2014). Cuando los complejos son constituidos por receptores iguales se denominan homómeros; mientras que, si son constituidos por receptores distintos, se denominan heterómeros (Figura 3). Aunque la mayoría de los oligómeros descritos constituidos por GPCR son dímeros, también se ha demostrado la existencia de formaciones de orden superior, como son los trímeros o tetrámeros. Este concepto de oligomerización también supone un cambio en el pensamiento clásico de que la estequiometría del complejo receptor: proteína G acoplada corresponde a

1:1. Estudios recientes proponen una relación 2:1, basada en las características funcionales de los estudiados oligómeros.

Así mismo, se ha descrito que la oligomerización ofrece nuevas propiedades a los receptores que constituyen el complejo; puede afectar la ontogenia e internalización, sus características farmacológicas o incluso el proceso de transducción de señal. Otorgando así, a los receptores acoplados a proteína G, un potencial farmacológico añadido, a su vez, que un aumento en la complejidad de su regulación. Así, la definición de heterómero es: complejo macromolecular compuesto por al menos dos unidades -funcionales- o protómeros con propiedades bioquímicas demostrablemente diferentes a la de sus componentes por separado. Por lo que no se consideran heterómeros, complejos formados por más de un receptor, si no son capaces de presentar una actividad independiente. Un ejemplo, sería el complejo que constituyen los receptores GABA_{B1} y GABA_{B2}, los cuales necesitan de su oligomerización para ser funcionales, por tanto, se consideran un complejo proteico.

Gran parte de la comunidad científica postula la interacción entre varios GPCR como un tipo de regulación alostérica, en la cual se considera que uno de los receptores que conforman el complejo actúa como modulador alostérico de uno o varios de los receptores asociados. Esta actividad alostérica entre receptores puede resultar en una cooperatividad positiva o negativa, entendiendo que la unión del ligando a un receptor es capaz de modular la acción del otro u otros receptores, modificando su unión a ligando y/o acoplamiento a proteína G (Navarro et al., 2016).

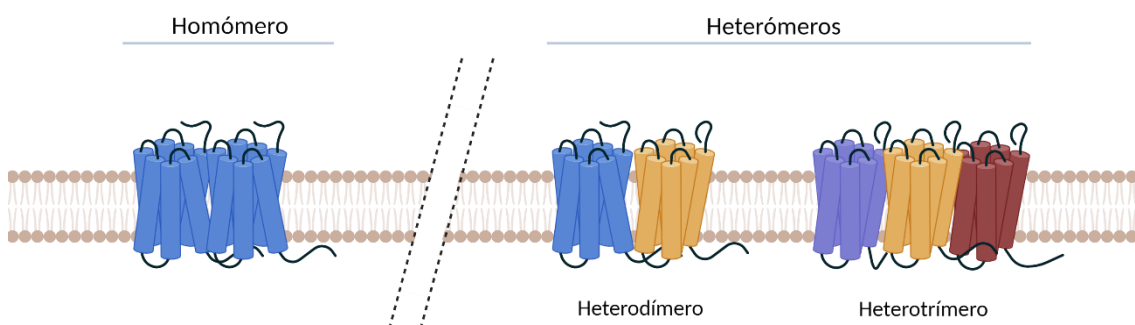


Figura 3. Oligomerización de receptores.

1.1.4.1 Implicaciones de la heteromerización de GPCR

La oligomerización de receptores da lugar a un conjunto de nuevas dianas terapéuticas con relevante potencial, debido a que los nuevos complejos presentan características distintas a las de sus componentes por separado, mostrando diferencias significativas a nivel de señalización, sensibilidad y/o afinidad por los ligandos correspondientes. Por lo que en el campo del desarrollo farmacéutico se abre una nueva ventana en la investigación de la diversidad farmacológica añadida, especialmente, por parte de los heterómeros de receptores acoplados a proteína G. Una de las grandes herramientas en el estudio de la dimerización, por ejemplo, son los ligandos bivalentes (Hübner et al., 2016). Estos ligandos están constituidos por dos farmacóforos unidos por un *linker* -o cadena de enlace- que son capaces de unirse a ambos centros ortostéricos de los dos protómeros de un dímero, ya sea homo- o heterodímero. Así resultan de gran utilidad para el conocimiento de las funciones características de ciertos oligómeros específicos, mejorando la selectividad de algunos fármacos. Aunque presentan limitaciones, como es la incapacidad de gran número de estos compuestos para atravesar la barrera hematoencefálica (Shonberg et al., 2011).

Para que una proteína se exprese a nivel de membrana plasmática, esta debe hallarse correctamente plegadas para evitar su retención en el retículo endoplasmático. A parte del correcto plegamiento de los GPCR, también se ha demostrado como la oligomerización puede dar lugar a un enmascaramiento de las señales específicas de retención en retículo, promoviendo la expresión en membrana (Ferré & Franco, 2010). Aunque se ha demostrado la presencia de complejos de GPCR a nivel del retículo endoplásmico mediante técnicas de transferencia de energía; como son la transferencia de energía resonante fluorescente y bioluminiscente (FRET y BRET), no se conoce el proceso por el cual los protómeros son capaces de reconocerse para su interacción específica. Del mismo modo en que no se ha descrito si tras el tráfico a membrana plasmática, los oligómeros son capaces de escindirse, dando lugar a un equilibrio dinámico entre las formas protoméricas y formadoras de homo- o hetero-oligómeros. Este concepto de dinamismo de receptores respalda las múltiples aproximaciones experimentales que defienden la formación de diferentes heterómeros en función de la concentración de ligando, sin descartar la oligomerización independiente de éste.

La activación del receptor y el acoplamiento a proteína G son otras de las características básicas que se pueden ver afectadas por la oligomerización, y que despiertan mayor interés a nivel fisiopatológico. Se han descrito diversos heterómeros en los que se observa que ante la coactivación de los diferentes protómeros por partes de sus agonistas se da un efecto mayor al obtenido ante la activación independiente de estos, fenómeno denominado *crosstalk* positivo. Otros en los que se ha descrito un *crosstalk* negativo -cuando la presencia de uno de los agonistas específicos de uno de los componentes es capaz de bloquear la acción derivada del agonista del otro u otros protómeros-. Otros fenómenos descritos son la transactivación y el crossantagonismo. Cuando el agonista específico de uno de los receptores es capaz de activar la función de otro receptor, aún en ausencia de su agonista específico, se trata de una transactivación. Cuando el antagonista de uno de los receptores es capaz de bloquear la actividad derivada por la activación de otro receptor, se trata de crossantagonismo.

Dado que la activación de los receptores conlleva un cambio conformacional, cabe destacar la importancia de la disposición espacial del complejo heteromérico y la estequiometría relativa a la unión a proteína G. En el caso de un heterómero formado por dos GPCR, la visión clásica esperaría una relación 1:1 y por lo tanto la presencia de dos proteínas G, posibilidad que, mediante estudios basados en la estructura del receptor, se sugiere es no posible en GPCR de clase A (Gusach et al., 2023; Mao et al., 2020). Aunque esta estequiometría se ha descrito recientemente en un receptor de clase D (Velazhahan et al., 2021). Mediante estudios diversos en heterómeros de receptores que canónicamente acoplan distintos tipos de proteína G, se han observado relaciones 4:2 en las que dos dímeros son capaces de oligomerizar albergando dos tipos distintos de proteína G, las cuales se ven activadas en función de la concentración de agonista. Característica que puede suponer en cambios funcionales relevantes en función del contexto en el que se encuentre el heterómero (Rafael Franco et al., 2018).

Otra implicación fisiológica de la oligomerización de GPCR se encuentra en la internalización del receptor dependiente de ligando. Se ha descrito que, tras la activación de uno de los protómeros del complejo, se puede producir la internalización del oligómero completo (Lavoie et al., 2002; Treppiedi et al., 2022). Así mismo, receptores que presentan una internalización fisiológica reducida, pueden actuar, al formar parte de un oligómero, como reguladores negativos de la internalización de los receptores con los que interaccionan. Este

cambio en el comportamiento de los receptores puede suponer una mejora en la farmacocinética de un compuesto.

Sin duda, el conocimiento sobre la formación de oligómeros de GPCR viene ligado al avance en las técnicas experimentales (I. Gomes et al., 2016):

Las técnicas de transferencia de energía resonante fluorescente (FRET) o bioluminiscente (BRET), se utilizan principalmente en sistema heterólogos de expresión para demostrar la interacción entre dos proteínas. Estos ensayos se basan en el uso de proteínas de fusión constituidas por las proteínas de estudio unidas a moléculas fluorescentes -o bioluminiscentes-. En el caso del BRET, la proteína que actúa como donante de energía se halla fusionada a la enzima renilla luciferasa (Rluc), y la proteína que actúa como aceptora, se encuentra fusionada a un fluorocromo, como puede ser la proteína amarilla fluorescente (YFP). En el caso de que las proteínas de interés se encuentren a una distancia inferior a 10 nm, en presencia del sustrato de la Rluc, coelenteracina H, se producirá la transferencia de energía, confirmando una interacción física entre ambas. En el caso del FRET, las moléculas donante y aceptora son dos fluorocromos con el espectro de emisión de la proteína donante con el mayor solapamiento posible con el espectro de excitación de la proteína aceptora.

La complementación de fluorescencia bimolecular (BiFC) es una técnica que se basa en la fusión de dos proteínas de interés a dos hemiproteínas no fluorescentes de la YFP. Si los receptores de estudio se hallan a menos de 6 nm, y por lo tanto se encuentran interaccionando físicamente, se dará lugar la reconstitución de la proteína YFP que emitirá fluorescencia a 530 nm. La combinación de esta técnica con otras como las de transferencia de energía resonante resultan en una herramienta útil para el estudio de complejos de orden superior.

Para detectar la formación de heterómeros en sistemas más fisiológicos, es decir, en cultivos primarios o en secciones de tejido, se han desarrollado el ensayo de ligación por proximidad, que permiten identificar la interacción entre proteínas a nivel tisular. Esta técnica depende del marcaje específico de las proteínas de interés mediante anticuerpos primarios específicos. A estos, se les unirán anticuerpos secundarios conjugados con sondas complementarias de oligonucleótidos. Si la distancia entre proteínas es inferior a 30nm, tras un proceso de ligación y una amplificación usando polimerasa y oligonucleótidos marcados con fluorescencia, se podrá detectar el oligómero como un punto fluorescente mediante microscopía confocal.

1.1.4.2. Ejemplos de heterómeros ordenados cronológicamente

Los primeros indicios de la posible formación de oligómeros por parte de receptores acoplados a proteína G se asocian a los estudios de R. Lefkowitz, en 1975, como se ha mencionado previamente, al describir una cooperatividad negativa entre receptores β -adrenérgicos (Limbird et al., 1975). Poco después, en 1978, el grupo de A. M. Watanabe observó como la metacolina, agonista no selectivo del receptor colinérgico muscarínico, era capaz de recuperar la afinidad por el agonista isoproterenol al receptor β_2 -adrenérgico (β_2 -AR) en presencia de GTP (Watanabe et al., 1978). Estos datos, entre otros, llevaron al planteamiento en el campo de los GPCR de una posible interacción receptor-receptor. A partir de ese momento, la comunidad científica mostró cada vez más interés en el estudio de la formación de oligómeros de GPCR, homo- y heterómeros. Por otro lado, el estudio farmacológico de ciertos compuestos, mostrando curvas de unión a ligando complejas,

también incitaban al planteamiento de complejos de receptores de órdenes superiores, no deteniéndose en la dimerización.

Las primeras aproximaciones experimentales, se basan en ensayos de saturación usando radio-ligandos con el objetivo de determinar el peso molecular de los componentes proteicos presentes en un complejo, técnicas que permitieron determinar que, entre otros, el β_2 -AR, los receptores opioides, los receptores muscarínicos o el receptor de dopamina D_1 eran capaces de formar homodímeros (Hebert et al., 1996). Múltiples técnicas han surgido durante las últimas décadas, enfocadas en el estudio de estas interacciones receptor-receptor, entre ellas el BRET, el FRET o la co-inmunoprecipitación.

Los GPCR presentan un amplio abanico de funciones a nivel del sistema nervioso central (SNC), el cual abarca, entre otros, procesos de control motor, cognición, memoria o propios del sistema de recompensa (Agnati et al., 2003). En consecuencia, gran potencial terapéutico de la oligomerización de estos receptores se enfoca en enfermedades neuropsiquiátricas como la enfermedad de Parkinson (EP), la esquizofrenia, la adicción o la enfermedad de Alzheimer. En la actualidad, se han descritos múltiples homómeros y heterómeros con implicaciones en estos trastornos (Albizu et al., 2010).

Los receptores de adenosina 1 (A_1R) y 2A ($A_{2A}R$) así como los de dopamina 1 (D_1R) y 2 (D_2R) son una de las dianas más comunes entre los estimulantes y los antipsicóticos. En la década de los 90 fue descrita la capacidad de los receptores A_1 , D_1 y D_2 para formar homodímeros (F Ciruela et al., 1995; Ng et al., 1994; Zawarynski et al., 1998). Teniendo esto en cuenta y la colocalización de estos a nivel tisular, se planteó la posibilidad de la heteromerización entre estos receptores.

El primer heterómero descrito entre los sistemas de adenosina-dopamina, también resultó ser el primer oligómero formado por dos neurotransmisores/neuromoduladores diferentes, y fue el complejo A_1R - D_1R (Ginés et al., 2000). Este heterómero presenta gran potencial en el tratamiento de la adicción. Brevemente, se ha reportado que la cocaína, compuesto alcaloide con fuerte acción estimulante del SNC, es capaz de unirse al complejo A_1R - D_1R , bloqueando la interacción entre ambos protómeros en el núcleo accumbens de rata (Schwienbacher et al., 2002). En estudios experimentales se ha observado como la acción de agonistas de A_1R es capaz de modificar el estado de afinidad de D_1R por sus ligandos. Por otro lado, la acción dependiente de proteína $G_{\alpha s}$ inducida por la activación del D_1R se ve potenciada en presencia de antagonistas de A_1R (Rivera-Oliver et al., 2019).

Otro heterómero entre los sistemas de adenosina y dopamina, la existencia del cual fue confirmada con técnicas de co-inmunoprecipitación y transferencia de energía resonante es el complejo $A_{2A}R$ - D_2R . Este heterómero resulta de gran interés en el estudio de la enfermedad de Parkinson, debido a la potenciación de la señalización mediada por D_2R cuando $A_{2A}R$ se encuentra bloqueado. Antagonistas del $A_{2A}R$ han demostrado actividad anti-parkinsoniana. Un ejemplo es la istradefilina, antagonista específico de $A_{2A}R$ aceptado como co-tratamiento en pacientes de EP, aprobado por la FDA en 2019, bajo el nombre comercial de Nourianz®.

La dopamina es un neurotransmisor catecolaminérgico crucial del SNC con funciones sobre el control motor y las vías de recompensa y reforzamiento cognitivo. Entre los receptores de dopamina, también se ha demostrado la oligomerización entre diferentes miembros de la misma familia. El heterómero D_2R - D_3R , presente en terminales sinápticos y proyecciones postsinápticas de neuronas dopaminérgicas del globo pálido, resulta de interés como diana terapéutica para la EP (Bono et al., 2020). Por otro lado, el heterómero D_1R - D_2R , es un claro

ejemplo de las diferencias a nivel funcional otorgadas por la oligomerización. Mientras los homodímeros de D₁R y D₂R acoplan las proteínas heterotriméricas G_{as} y G_{ai}, respectivamente. La transducción de señal asociada al heterómero D₁R-D₂R depende de su acoplamiento a la proteína G_{αq/11}. Existen otros heterómeros compuestos por receptores de dopamina que han sido descritos a lo largo de las últimas décadas en tejido cerebral, como es el caso del heterómero D₁R-D₃R en estriado.

Por lo que respecta a los receptores de adenosina, la demostración de la formación del heterómero A₁R-A_{2A}R fue el primer paso para una extensa investigación de la interacción entre los miembros de esta familia de receptores. El caso más estudiado, sin embargo, es el del complejo A₁R-A_{2A}R. A nivel estructural, se ha descrito su conformación tetramérica, constituida por un homodímero de A₁R y un homodímero de A_{2A}R, capaz de acoplar dos proteínas G heterotriméricas distintas, G_{as} y G_{ai}. Mediante aproximaciones experimentales, se ha demostrado que este complejo es capaz de señalar de manera distinta en función de la concentración de adenosina, actuando como un “sensor” a nivel tisular. Así como, su capacidad para regular, de manera dosis-dependiente, la recaptación del neurotransmisor ácido γ-aminobutírico (GABA) en astrocitos. Otros heterómeros descritos de receptores de adenosina incluyen: A_{2A}R-A₃R y A₁R-A₃R.

La complejidad de la regulación de los procesos fisiopatológicos de los trastornos que afectan al SNC no se limita a las moléculas de adenosina y dopamina, otros neurotransmisores como la serotonina o el glutamato juegan también un rol esencial. En el caso de los receptores de serotonina (5-HTR), han sido descritos varios heterómeros. Entre ellos la interacción entre el receptor de serotonina 1A (5-HT_{1A}R) y el receptor de cannabinoides 2 (CB₂R); o el heterómero entre 5-HT_{2A}R y el receptor metabotrópico de glutamato de tipo 2 (mGluR₂). Este último, presenta un potencial importante como diana de compuestos antipsicóticos para el tratamiento de la esquizofrenia, ya que agonistas de mGluR₂ inhiben la acción alucinógena derivada de la acción dependiente de 5-HT_{2A}R mediante la formación del complejo 5-HT_{2A}R-mGluR₂. Otro receptor de glutamato, el mGluR₅ ha sido descrito como parte de un complejo de orden superior formado por los receptores D₂R, A_{2A}R y mGluR₅ (Cabello et al., 2009). En este caso, se ha observado que el uso de antagonistas de mGluR₅, así como de A_{2A}R, reduce la catalepsia inducida por el haloperidol, antipsicótico de primera generación de uso habitual en pacientes esquizofrénicos, antagonista de D₂R (Romero-Fernandez et al., 2022).

Otro heterómero de orden superior que se propone como posible diana terapéutica en la esquizofrenia, aunque aún no se ha podido dilucidar su funcionalidad como complejo, es el conformado por A_{2A}R, D₂R y el receptor de cannabinoides 1 (CB₁R). De hecho, en muestras *post mortem* de cerebros de pacientes esquizofrénicos se hallan alterados los tres componentes de este heterotrímero.

Así pues, la oligomerización de receptores acoplados a proteína G añade un nuevo nivel a la complejidad intrínseca de los procesos fisiológicos, y permite el avance en el entendimiento y por tanto en el desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento de múltiples trastornos y afectaciones.

1.2. Sistema adenosinérgico

La adenosina es un nucleósido formado por una molécula de adenina y una ribofuranosa que es sintetizado por todas las células del organismo. Este nucleósido, así como sus

derivados, presentan un rol crucial en el metabolismo y consumo energético de los órganos y los tejidos, y participan activamente en diversos procesos fisiológicos.

Principalmente la producción de adenosina a nivel intra- y extracelular se regula mediante el equilibrio ATP/Adenosina (Figura 4). A nivel intracelular, la acción de la enzima 5-nucleotidasa (5'-NT) será capaz de catalizar la conversión del AMP, producto del consumo de ATP, a adenosina. Aunque han sido descritas otras vías, como la hidrólisis de la S-adenosil-L-homocisteína que da lugar a adenosina y homocisteína. A nivel extracelular, la adenosina puede proceder del interior celular, mediante la actividad de transportadores; o ser sintetizada por la conversión del ATP presente en el espacio intersticial en AMP y adenosina mediante la acción de las enzimas ecto-nucleósido-trifosfato disfosfohidrolasa CD39 y la 5'-nucleotidasa CD73, respectivamente (Borea et al., 2018; DeNinno, 1998).

A nivel del SNC podemos afirmar que la adenosina es un neurotransmisor, así como un neuromodulador. Su producción, y la de sus derivados, ha sido descrita a nivel de sinapsis, dónde actúa como un autocoide capaz de ejercer sus funciones mediante la unión a dos tipos de receptores: los P1 y los P2. Aunque la adenosina se considera funcionalmente como un neurotransmisor, presenta ciertas características que la alejan de otros neurotransmisores como la dopamina o el glutamato. Hay que destacar que el transporte de la adenosina a nivel sináptico no se da mediante vesículas y que su recaptación se da de manera relativamente lenta, ejerciendo, así, un efecto más prolongado. Extracelularmente, la adenosina puede ser metabolizada mediante enzimas como la adenosina-desaminasa (ADA), dando lugar al nucleósido inosina, intermediario de la síntesis de ácidos nucleicos y de la degradación de purinas. A nivel de sinapsis, también se ha descrito la captación de adenosina por parte de astrocitos, los cuales son capaces de reciclar el nucleósido formando AMP, mediante la acción de la adenosina-quinasa (ADK), que se expresa principalmente en este tipo celular.

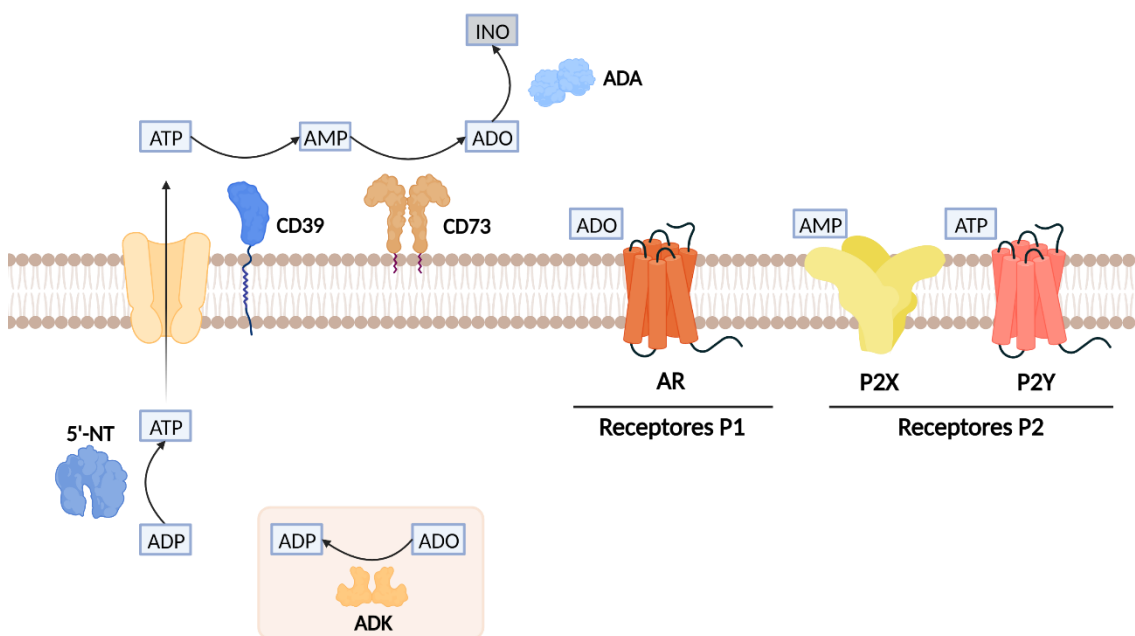


Figura 4. Síntesis de adenosina y receptores de membrana. [Abreviaturas en figura: Inosina (INO), Adenosina-desaminasa (ADA), Adenosina (ADO), Adenosín monofosfato (AMP), Adenosín trifosfato (ATP), Receptores de adenosina (AR), 5-nucleotidasa (5'-NT), Adenosín difosfato (ADP), Adenosina-quinasa (ADK)]

Tradicionalmente, la adenosina se ha considerado como un inhibidor de la actividad neuronal, teniendo en cuenta su función en el control del ciclo sueño-vigilia; así como un regulador del flujo sanguíneo en el encéfalo. También se han descrito múltiples funciones de la adenosina relacionadas con la respuesta al daño tisular (Jacobson & Gao, 2009). Ante una lesión, el desbalance oxigénico dispara la formación de adenosina, la cual puede actuar disminuyendo la demanda energética tisular y regulando el sistema inmune, mostrando un potencial en el tratamiento de desórdenes neuroinflamatorios (S. T. Lee & Venton, 2018).

El cerebro en reposo presenta una concentración de adenosina intersticial cercana a 20 nM, mientras que, en condiciones de lesión o estrés tisular esta puede incrementar hasta los 100 μ M (Ganesana & Venton, 2018). Se han asociado múltiples mecanismos a este aumento. Por un lado, la lisis celular, con la subsecuente liberación de ATP al espacio intercelular, y su catálisis vía ectonucleotidasas. Por otro lado, se ha descrito una posible relación entre el incremento de los niveles de adenosina y la respuesta orgánica a la situación lesiva. En el caso de crisis o focos isquémicos, la necesidad debida a la demanda energética o la falta de metabolitos implica un aumento del gasto de ATP y, por lo tanto, un aumento de adenosina en el espacio extracelular.

Actualmente, a nivel clínico, el uso de la adenosina se limita al ámbito cardiológico. La inyección intravenosa de adenosina se considera un medicamento antiarrítmico, habitualmente administrado en pacientes que sufren de taquicardias supraventriculares, dónde su función vasodilatadora ayuda a normalizar el ritmo cardíaco (Delacrétaiz, 2006).

1.2.1. Receptores de adenosina

La adenosina y sus derivados son capaces de ejercer sus funciones mediante su unión a los receptores purinérgicos P1 y P2 (Figura 4). Concretamente, los nucleótidos de adenina, como son el ATP y el ADP son capaces de activar los receptores P2. Dentro de este subgrupo, se diferencian dos tipos de receptores: Los P2X, que son canales iónicos con preferencia por la unión a ATP, y los P2Y, que agrupan receptores acoplados a proteína G y presentan una mayor afinidad por el ADP (Burnstock, 2018). Los receptores P2X requieren de su oligomerización para la formación del poro del canal, y por tanto para su funcionalidad. Polimorfismos descritos de estos receptores se han asociado a diversas enfermedades como son la presión de pulso elevada o la degeneración macular relacionada con la edad (Caseley et al., 2014). El subgrupo 2PY se encuentra implicado en enfermedades como la EA. Debido a que se ha detectado la colocalización de estos receptores con ovillos neurofibrilares en el hipocampo de cerebros *post-mortem* de pacientes de EA (Moore et al., 2000).

En esta Tesis doctoral, centraremos nuestro interés en los receptores P1, que tienen como ligando endógeno la adenosina. Estos receptores fueron clonados y caracterizados a principios de la década de los 90, concretamente, se han descrito 4 tipos de receptores de adenosina: A₁R, A_{2A}R, A_{2B}R y A₃R (Fredholm et al., 2000). Estos receptores forman parte de la familia de GPCR de clase A y se diferencian, principalmente, por su afinidad a la adenosina y por la proteína G a la que canónicamente se acoplan (Figura 5). Los receptores que presentan una elevada afinidad por la adenosina son el A₁R y el A_{2A}R, mientras que el A_{2B}R y el A₃R presentan una baja afinidad por el nucleósido. La expresión, así como la afinidad diferencial entre estos receptores otorgan a la adenosina un rango de acción amplio ante diferentes estados fisiológicos, y, en diferentes tejidos.

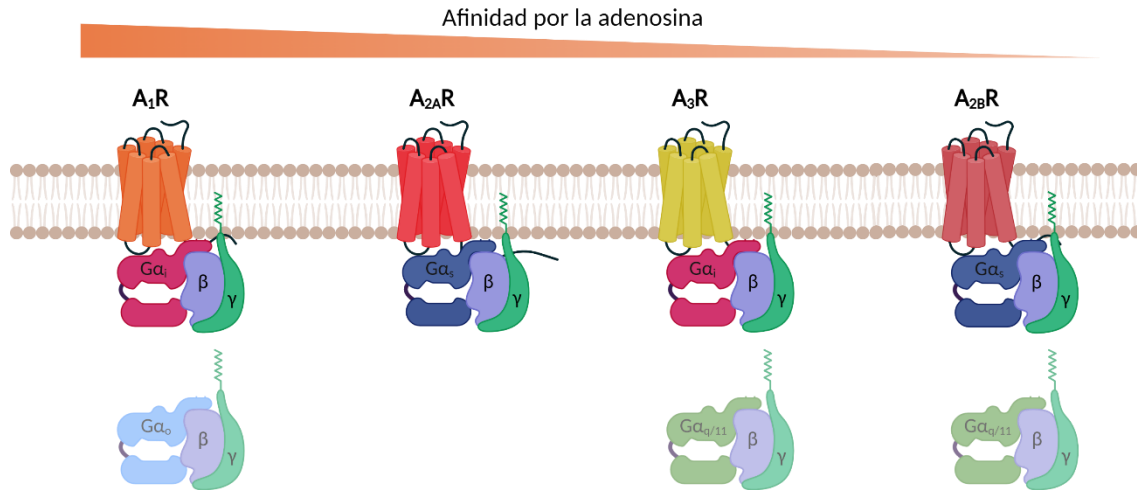


Figura 5. Receptores de adenosina P1 ordenados por su afinidad por la adenosina. Principales proteínas G a las que se acoplan.

1.2.1.1. Receptor de Adenosina 1 (A_1R)

El receptor de adenosina 1 (A_1R) es un receptor constituido por una única cadena polipeptídica, que viene codificada por el gen *ADORA1* y que se expresa de manera ubicua en la mayoría de tejidos, con una elevada expresión en el SNC, teste y tejido adiposo, pero también en corazón, riñón y piel (Sheth et al., 2014).

El receptor A_1 , es un GPCR de la clase A capaz de acoplar canónicamente a la proteína $G_{\alpha i}$, inhibiendo así la acción de la AC. La desensibilización del receptor se produce por la acción del sistema GRK-arrestinas, activando la fosforilación de MAPK. En ciertas regiones del SNC también se puede provocar la activación de proteína-fosfatasa y quinasas, como la p38 o las JNK.

El A_1R , así como el $A_{2B}R$, se expresa en el tejido adiposo blanco en múltiples especies. La activación del A_1R en tejido adiposo conlleva efectos anti-lipolíticos, debido a su inhibición de la AC que reduce la actividad de lipasas intracelulares (Tozzi & Novak, 2017). También se ha descrito que la activación del A_1R es capaz de regular la lipogénesis mediante la captación de glucosa (Johansson et al., 2008). Puntualizar que en condiciones en las que se da una sobreexpresión del A_1R se ha observado una acción protectora ante la resistencia a insulina, la cual también se puede asociar con la elevada captación de la glucosa en circulación (Don et al., 2001).

En el sistema nervioso central, especialmente a nivel del encéfalo, la mayoría de las funciones fisiológicas de la adenosina se asocian a la actividad del A_1R (Stockwell et al., 2017). Su expresión no presenta una limitación regional, ya que se extiende a diferentes partes del cerebro, así como se expresa en múltiples tipos celulares como son neuronas, astrogliá y microgliá (Martí Navia et al., 2020).

El A_1R , con una afinidad cercana a 70 nM por la adenosina, se considera clásicamente un efector inhibitorio. La adenosina es capaz de modular la neurotransmisión tanto en el contexto presináptico como postsináptico. En lo que respecta a la actividad del A_1R a nivel presináptico, su activación reduce la liberación de neurotransmisores al espacio sináptico (Dunwiddie & Haas, 1985; Rebola et al., 2003). En el caso del terminal postsináptico, su

activación conlleva la reducción de la excitabilidad celular, dando lugar así, a una depresión sináptica (Thompson et al., 1992). Como ejemplos cabe destacar la modulación negativa que ejerce A₁R sobre el sistema dopaminérgico y el sistema glutamatérgico. Modulación resultante del bloqueo alostérico de la señalización dependiente de D₁R al formar heterómeros con el A₁R en terminales postsinápticos (Ferré, 2010). En hipocampo, dónde gran parte de la actividad de la adenosina se da mediante su unión a A₁R, se ha descrito como la activación de este receptor induce la internalización de receptores ionotrópicos de glutamato AMPA, añadiendo un nivel extra de complejidad a su modulación (Stockwell et al., 2016).

Debido a su efecto inhibitorio, también se considera al A₁R como un agente neuroprotector. En modelos de hipoxia/isquemia, se ha descrito que la depresión sináptica glutamatérgica causada por la actividad de A₁R, previene la excitotoxicidad derivada de la acumulación de glutamato asociada a estos episodios (Obrietan et al., 1995). A su vez, la disminución en la excitabilidad neuronal, así como en el consumo energético, se sugiere que mejoran la tolerancia celular a la hipoxia (Y. Zhang et al., 2020). En modelos de epilepsia del lóbulo temporal, se ha identificado, también, el potencial neuroprotector de A₁R, reduciendo, de nuevo, el fenómeno de excitotoxicidad y la muerte neuronal en hipocampo (Rosim et al., 2011).

La función neuroprotectora del A₁R no se limita a su acción sobre la neurotransmisión (Martí Navia et al., 2020). Se ha descrito que el A₁R se expresa y tiene un rol específico en la activación de la microglía. En modelos *knock out* (KO) para el A₁R, de hecho, se ha observado un aumento en la activación de la microglía, y también en la neuroinflamación asociada al desarrollo de glioblastomas (Synowitz et al., 2006). Así mismo, la expresión del A₁R en astrocitos se ha asociado a la reducción de su proliferación y al aumento en la secreción del factor de crecimiento neuronal (Sheth et al., 2014). Más concretamente, en astrocitos incubados con antagonistas de A₁R se observó la abolición del efecto neuroprotector del resveratrol, fenol natural capaz de proteger a las células astrogiales de la muerte inducida por estrés oxidativo (Bobermin et al., 2019).

Las implicaciones fisiológicas del A₁R, pero, no dependen únicamente de su forma homomérica, también participa en diversos heterómeros implicados en varios contextos patológicos. En procesos isquémicos, la presencia del heterómero A₁R-A_{2A}R se ha relacionado con el desbalance en la recaptación de glutamato (Hou et al., 2020). Este mismo complejo se ha definido como un sensor de adenosina a nivel tisular (Navarro, Cordoní, et al., 2018). En condiciones fisiológicas, la concentración de adenosina presente en el tejido se unirá preferentemente al A₁R, mientras que, en condiciones isquémicas, el aumento de adenosina permite su unión también al A_{2A}R, que bloqueará la activación de A₁R. En este caso, la secreción de glutamato aumentaría, y con ella la excitotoxicidad. Se ha observado que el tratamiento con agonistas específicos de A₁R o antagonistas de A_{2A}R, es capaz de revertir esta modulación negativa, incrementando la recaptación de glutamato. Se ha planteado las posibles implicaciones del heterómero A₁R-A_{2A}R en otras patologías como en la EP, dónde la desregulación de receptores moduladores presinápticos, como es el complejo A₁R-A_{2A}R (Ciruela et al., 2006), induce la excitotoxicidad y promueve la muerte neuronal (Fernández-Dueñas et al., 2017).

Otro heterómero que contienen el A₁R, relevante en enfermedades neuropsiquiátricas, es el complejo A₁R-D₁R. De hecho, diversos estudios defienden que parte de la acción antagónica de la adenosina y la dopamina a nivel cerebral viene dada por la formación de este heterómero (Franco et al., 2007). Se ha descrito que la activación del receptor A₁ conlleva una pérdida de la afinidad del receptor D₁ por sus agonistas específicos. En motoneuronas

espinales, se ha descrito que la adenosina, mediante su unión al complejo, es capaz de ejercer una inhibición tónica de la excitabilidad neuronal derivada de la acción de la dopamina (Rivera-Oliver et al., 2019). Finalmente, en modelos de EP, se ha observado que el tratamiento con antagonistas de A₁R presenta el mismo efecto que tratamientos estimulantes, activadores de los receptores de dopamina.

1.2.1.2. Receptor de Adenosina 2A (A_{2A}R)

El receptor de adenosina 2A (A_{2A}R) es uno de los GPCR mejor caracterizados a nivel atómico, dada la existencia de más de treinta cristales de su estructura (Carpenter & Lebon, 2017). Dentro de los receptores de adenosina, el A_{2A}R presenta una mayor homología con el receptor de adenosina A_{2B} (A_{2B}R), la cual asciende al 61% en humano (Jones et al., 2017). El A_{2A}R se acopla a proteína G_{αs} y se expresa de manera ubicua en el organismo, aunque es más abundante en células del sistema inmune y en los ganglios basales a nivel de SNC (Fredholm et al., 2000).

El A_{2A}R se acopla a proteína G_{αs}, la cual promueve la función de la AC, incrementando así la acumulación de AMPc, activando la PKA. Una de las funciones derivadas de la PKA es, mediante la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB), regular vías como la fosforilación de MAPK de manera dependiente de proteína G (Koga et al., 2019). Aunque el A_{2A}R, presenta cierta resistencia a la desensibilización, puede ser internalizado mediante el sistema GRK-arrestina, activando así la vía de MAPK de manera independiente a proteína G (Khoa et al., 2006). Una de las principales características que diferencian al A_{2A}R del resto de receptores de adenosina es su extremo C-terminal de mayor longitud. Este dominio de más de 120 aminoácidos ha sido descrito como crucial para la interacción del A_{2A}R con múltiples proteínas, así como para la correcta señalización intracelular del receptor (Navarro et al., 2020).

La activación del A_{2A}R presenta diversos efectos como son la vasodilatación, la capacidad de promover el sueño y la de modular la respuesta inmune y la inmunosupresión, siendo expresado en los linfocitos T, macrófagos, células dendríticas, microglía y astrocitos (Ohta & Sitkovsky, 2009). La activación del A_{2A}R induce la acumulación de AMPc, que genera un descenso en la producción de citoquinas proinflamatorias en células dendríticas, imprescindible para la actividad supresora de los linfocitos T reguladores (Treg) (Raker et al., 2016). Por lo que, a nivel terapéutico, se plantea el potencial uso de antagonistas específicos de A_{2A}R para extender la función inmune y mejorar la respuesta ante una lesión.

Se sugiere que la función inmunosupresora del A_{2A}R forma parte de una respuesta sistémica ante un ataque al propio tejido, modulando la posible exacerbación de la respuesta inmune que puede resultar lesiva. Es decir, una compensación del daño colateral derivado de la respuesta inmune inicial. Datos que defienden esta teoría son: la elevada expresión del receptor en nódulos linfáticos y en bazo (Thiel et al., 2003); así como, que la activación del A_{2A}R, dada su afinidad, tendrá lugar cuando la concentración de adenosina supere cierto umbral, asociado habitualmente a situaciones patológicas (Sitkovsky et al., 2004). La función moduladora del A_{2A}R en el sistema inmune se ha descrito en múltiples contextos fisiopatológicos, habitualmente asociados a episodios de hipoxia y/o isquemia, donde se produce un aumento drástico de la adenosina intersticial. Otro ejemplo es el microambiente tumoral, donde el A_{2A}R promueve la polarización de los macrófagos a un fenotipo M2, y limita la maduración de las células *Natural Killer* (Young et al., 2018). Así, la activación de A_{2A}R favorece el desarrollo del tumor.

El uso de ligandos específicos del A_{2A}R en el ámbito de las enfermedades neuropsiquiátricas no es un concepto nuevo. Existen varios antagonistas de A_{2A}R que se encuentran actualmente en proceso de aprobación, como el PBF-509 (NIR-178) para el tratamiento de tumores sólidos (Núñez et al., 2018). Otro compuesto que se encuentran en el mercado es la istradefilina, como co-tratamiento, junto a la levodopa (L-DOPA), en la enfermedad de Parkinson. Otros compuestos han sido suspendidos debido a sus efectos adversos: tozadenant, suministrado también en pacientes de EP.

En el caso de la enfermedad de Alzheimer, se ha descrito que la inhibición de A_{2A}R supone una mejora en los síntomas asociados a la función cognitiva, mejorando la pérdida de memoria y disminuyendo la hiper-fosforilación de la proteína tau (Arosio et al., 2016). En muestras *post-mortem* de pacientes de EA, se ha detectado la sobreexpresión de A_{2A}R en neuronas y astrocitos del área cortical (Angulo et al., 2003)(Orr et al., 2015). Se ha descrito como la presencia del péptido β -amiloide (A β) incrementa la excitabilidad de los astrocitos, afectando negativamente a la transmisión sináptica. La activación de A_{2A}R en astrocitos regula la acumulación de calcio (Ca²⁺) intracelular, así como la secreción de glutamato, promoviendo así, el deterioro neuronal propio de la EA (Lopes et al., 2021).

Otras afectaciones neurológicas en las que se ha observado un efecto protector inducida por los antagonistas específicos de A_{2A}R son la esclerosis lateral amiotrófica, provocando un incremento en la supervivencia de las motoneuronas (Mojsilovic-Petrovic et al., 2006); o la epilepsia, en la cual la acción de A_{2A}R resulta proconvulsiva (Malva et al., 2003). En la EP, también se observa un efecto beneficioso, ya que el uso de antagonistas de A_{2A}R limita la secreción de glutamato reduciendo la muerte neuronal.

En SNC, el receptor A_{2A} presenta una afinidad para la adenosina cercana a 150 nM, expresándose principalmente en la vía indirecta eferente de los ganglios basales. A nivel de los terminales postsinápticos de las neuronas GABAérgicas, el A_{2A}R puede modular la actividad motora mediante su interacción con el receptor de dopamina D₂ (Mori, 2014). Concretamente, la activación del A_{2A}R modula negativamente la acción del D₂R. Del mismo modo que, el bloqueo de A_{2A}R es capaz de revertir el bloqueo de la función motora producida por la modulación negativa sobre el D₂R. Este fenómeno se ha asociado a la formación de heterómeros A_{2A}R-D₂R (Ferré et al., 2018). En condiciones patológicas, el A_{2A}R es capaz de incrementar la secreción de glutamato en la hendidura sináptica, incrementando así la excitotoxicidad. Esta liberación también estimula a los receptores glutamatérgicos mGlu, que forman complejos con los receptores A_{2A} y D₂. El heterotrímero A_{2A}R-D₂R-mGluR₅ muestra efectos anti-parkinsonianos en presencia de antagonistas de A_{2A}R y mGluR₅, ya que ambos receptores pueden actuar sinérgicamente inhibiendo al receptor D₂ (Pinna et al., 2018). Otros estudios reflejan que el CB₁R es capaz de interactuar con los receptores A_{2A} y D₂ con una posible implicación sobre el control motor (Navarro et al., 2008).

1.2.1.3. Receptor de Adenosina 3 (A₃R)

El receptor de adenosina 3 (A₃R) es un GPCR de clase A, clasificado como un receptor con baja afinidad por su ligando endógeno, adenosina. Fue el último receptor de adenosina del subtipo P1 a ser clonado, y es el que menor homología presenta con el resto de los receptores P1, no superando el 50% de identidad con ninguno de ellos (Jones et al., 2017). Así mismo, también es el receptor de adenosina menos conservado entre especies. Una de sus características diferenciales es su extremo C-term, que es relativamente corto, con una secuencia rica en serinas y treoninas, epítomos con gran potencial de fosforilación que explican la rápida desensibilización de este receptor.

Los órganos que presentan una mayor expresión del A₃R son el pulmón y el hígado, aun así, su presencia se ha detectado en otros tejidos como el riñón, la placenta, el corazón, el cerebro y el testículo. El A₃R se acopla a proteína G_{ai}, y por tanto induce la inhibición de la actividad AC, disminuyendo los niveles de AMPc intracelulares. Se ha descrito que la función del A₃R mediada por las subunidades G_{βγ} es capaz de activar múltiples cascadas de señalización, entre ellas la dependiente de la proteína quinasa B (AKT), Ras y ERK1/2. También se ha observado el acoplamiento de A₃R a la proteína G_{αq/11}, activando la PLC y regulando de este modo la acumulación de Ca²⁺ intracelular, en cerebro de rata y líneas estables de cáncer de vejiga humana. Repercutiendo así, en la regulación de la expresión génica (Gessi et al., 2011; Kanno et al., 2012). Para A₃R se han descrito ligandos sesgados a favor del reclutamiento de β-arrestinas, convirtiéndose en moléculas con gran potencial terapéutico, dada su especificidad funcional.

La activación de A₃R se asocia con funciones antiinflamatorias. Se ha descrito que la activación de A₃R es capaz de inhibir la producción de radicales de oxígeno y del anión superóxido en eosinófilos y monocitos (Ezeamuzie & Philips, 1999). De hecho, se ha descrito que los agonistas específicos de A₃R son fuertes inhibidores de la función monocitaria, sugiriendo un rol del A₃R en la regulación de células inmunitarias en circulación (Broussas et al., 1999). En células dendríticas, se ha observado que la estimulación con lipopolisacárido (LPS) induce una disminución de los transcritos de A₃R y A₁R (Panther et al., 2001). Efecto que repercute negativamente en la regulación que ejercen las células dendríticas sobre los linfocitos T exacerbando, así, el proceso inflamatorio (X. Song et al., 2018).

En tejidos en pleno proceso inflamatorio, como es el caso de la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn, y en diferentes tipos de cáncer, el receptor A₃ ejerce su efecto antiinflamatorio a la vez que se encuentra sobreexpresado (Ochaion et al., 2009). Estos resultados han conducido a la realización de ensayos clínicos con este receptor como diana principal. Dos ejemplos son el Piclidenoson y el Namodenoson, agonistas selectivos con alta afinidad por A₃R. Ambos son capaces de inducir la apoptosis en células cancerosas e inflamatorias asociadas al microambiente tumoral (Fishman, 2022). Esta acción se atribuye, a la desregulación de las vías de señalización mediadas por Wnt y el factor nuclear NF-κB y se asocia al potencial terapéutico de A₃R (H.-S. Lee et al., 2011).

Aunque se encuentra en una baja concentración, la presencia del A₃R en cerebro se extiende a diversas áreas cerebrales: el hipocampo, el córtex, el estriado y el cerebelo. También se expresa en múltiples tipos celulares, entre ellos las neuronas, la microglía y los astrocitos (Sheth et al., 2014). Este receptor pertenece al grupo de receptores de adenosina de baja afinidad, con una constante de 6500 nM para la adenosina (Dunwiddie & Masino, 2001).

La principal función del A₃R a nivel neurológico y cardíaco, es su capacidad de proteger el tejido tras un episodio de hipoxia/isquemia (Koda et al., 2010). Además, también se ha descrito como la activación de A₃R es capaz de inducir un estado de preconditionamiento en el miocardio, antes de un proceso de isquemia, ejerciendo un efecto protector tanto a corto como a largo plazo (Peart & Headrick, 2007).

Después de un episodio isquémico, aparece cierta excitotoxicidad, un aumento del estrés oxidativo y un proceso de neuroinflamación que favorecen el desarrollo de lesiones cerebrales que pueden afectar gravemente al individuo, o incluso suponer letales (Belov Kirdajova et al., 2020). La activación del A₃R presenta funciones claves en la respuesta post-isquémica, como se ha demostrado mediante modelos KO para A₃R, ejerciendo un rol neuroprotector. Más concretamente, se ha descrito que la activación del A₃R es capaz de

modular negativamente la producción y secreción de citoquinas proinflamatorias por parte de microglía activada (I. Y. Choi et al., 2011; H. Khan et al., 2022). Por ejemplo, el tratamiento de la microglía con un agonista de A₃R induce la inhibición de la producción de TNF- α . Esta modulación conduce a una disminución en la infiltración de células periféricas al cerebro y disminuye la excitotoxicidad causada por células reclutadas a la lesión isquémica (I. Y. Choi et al., 2011).

En estudios comportamentales se ha observado que ratones deficientes en A₃R (A₃R^{-/-}) presentan una menor sensibilidad a estímulos de dolor. En paralelo, el uso de agonistas de A₃R ha demostrado mejoras sustanciales en situaciones de dolor (Fedorova et al., 2003; Little et al., 2015; Yan et al., 2016). Por otro lado, se ha descrito que la activación de A₃R causa depresión motora, y contrariamente, en animales A₃R^{-/-} se observa una hiperlocomoción, fenómenos que abren una ventana terapéutica enfocada a trastornos con afectaciones motoras, como es la EP. En estudios realizados sobre la lesión cerebral traumática, se ha observado que el uso de agonistas de A₃R es capaz de reducir el daño tisular secundario asociado, así como el efecto causado por el infarto cerebral (Farr et al., 2020). En este mismo estudio se ha comprobado que semanas posteriores a la lesión, los animales tratados con el agonista específico de A₃R demuestran un mejor rendimiento en los test conductuales de reconocimiento de objeto nuevo y ubicación del objeto y en el de laberinto en T (Farr et al., 2020). Así, el potencial neuroprotector del A₃R se extiende también, a la mejora de la función cognitiva.

Actualmente, se han descrito dos complejos heteroméricos que contienen el receptor de adenosina A₃, ambos con otros receptores de adenosina: A₁R y A_{2A}R. El complejo A₁R-A₃R ha sido propuesto mediante interacciones alostéricas (Hill et al., 2014). Sin embargo, estudios directos con técnicas de detección de heterómeros siguen pendientes para su confirmación. Por otro lado, el heterómero A_{2A}R-A₃R, ha sido descrito mediante técnicas de transferencia de energía resonante en un sistema de expresión heteróloga, y mediante el análisis de su función característica en cultivos primarios de neuronas corticales (Lillo et al., 2020). La actividad del A₃R en el heterómero se ve totalmente inhibida por la presencia de A_{2A}R, acción revertida tan solo en presencia de antagonistas específicos de A_{2A}R. Por lo que, de nuevo, observamos la complejidad del sistema adenosinérgico y su rol en diferentes trastornos fisiopatológicos.

1.3. Sistema endocannabinoide

El sistema endocannabinoide (SEC) está constituido por los cannabinoides endógenos, denominados endocannabinoides (eCB); las enzimas que sintetizan, así como, las que degradan dichos endocannabinoides, y los receptores de cannabinoides (CBR). Participa en múltiples procesos fisiológicos. Principalmente, presenta funciones moduladoras, regulando la homeostasis celular, regulando la actividad del sistema inmunológico y procesos del SNC como el estado de ánimo, la percepción del dolor o el aprendizaje y la memoria.

Los primeros y principales, endocannabinoides se describieron en la década de los 90. El primero fue la N-araquidonoiletanolamida o anandamida (AEA), seguido pocos años después por el 2-araquidonoglicerol (2-AG) (R Mechoulam et al., 1995). Sin embargo, el interés de la comunidad científica por el SEC tiene su origen varias décadas antes de la descripción de los eCB. Existe constancia de que la especie vegetal *Cannabis sativa* ha sido utilizada tanto en aspectos medicinales, recreacionales e incluso ceremoniales desde el siglo VI a.e.c (Mechoulam, 1986). El uso del cánnabis, en múltiples formatos, se ha asociado desde

la antigüedad con efectos antiinflamatorios y, especialmente, psicotrópicos. Por lo que, el estudio del SEC surge de la investigación de los efectos ejercidos por los compuestos extraídos del *Cannabis sativa*, los cuales se denominan fitocannabinoides (fCB).

El descubrimiento de los receptores de cannabinoides se inicia, por lo tanto, con el estudio de la farmacocinética y el mecanismo de acción de los fCB. Inicialmente, se postulaba la posibilidad de que los compuestos fCB simplemente atravesaban la membrana plasmática de manera independiente a la acción de un receptor, teniendo en cuenta su carácter hidrofóbico. En la década de los 80, pero, se observó que los fCB psicotrópicos son capaces de inhibir la acción de la AC mediante la actividad de proteínas $G_{\alpha i}$ (Howlett, 2005). Así mismo, mediante el uso de ligandos radiomarcados, se demostró la presencia de lugares de unión de alta afinidad de estos compuestos en diversos tejidos. Finalmente, en 1990 se clonó el receptor de cannabinoides 1 (CB₁R), seguido tres años más tarde del receptor de cannabinoides 2 (CB₂R). Ambos receptores, CB₁ y CB₂, se consideran los receptores canónicos de cannabinoides, pero se han descrito otros receptores en los que los eCB muestran cierta afinidad, como son los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPAR) y el receptor de potencial transitorio vaniloide 1 (TRPV1) (Figura 6). En los últimos años, la investigación de las funciones del SEC ha llevado a postular la denominación de otros receptores como receptores cannabinoides. El GPR55 o el GPR18 son dos ejemplos de estos, la implicación de los cuales se ha descrito en contextos patológicos, como la EA, dónde su función se asocia al proceso inflamatorio (Medina-Vera et al., 2023; Reyes-Resina et al., 2018).

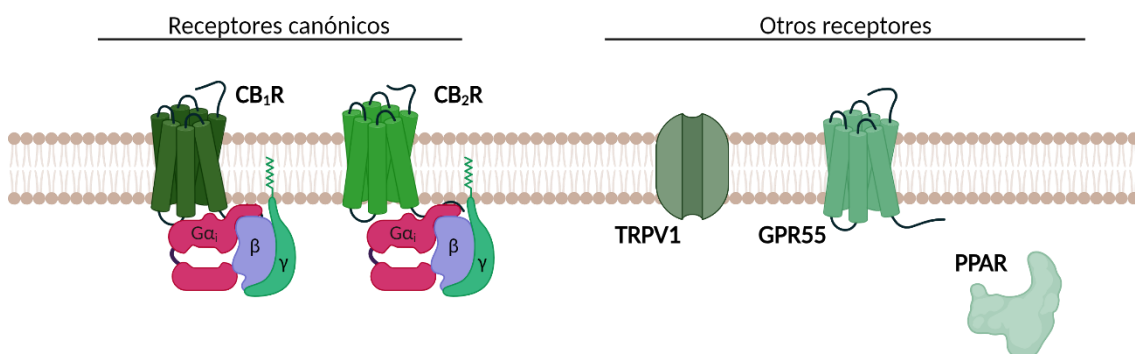


Figura 6. Receptores canónicos de cannabinoides y otros receptores descritos con afinidad por los endocannabinoides. [Abreviaturas en figura: Receptor de cannabinoides (CBR), Receptor de potencial transitorio vaniloide 1 (TRPV1), Receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPAR)]

Las enzimas encargadas de las rutas metabólicas de síntesis y degradación de los eCB son otro de los componentes principales del SEC. Por un lado, la síntesis de la anandamida puede darse mediante múltiples vías. La primera en ser descrita es la hidrólisis de la N-acil-fosfatidiletanolamina (NAPE) mediada por la fosfolipasa D específica de NAPE (NAPE-PLD). La segunda vía más estudiada, se ha descrito en cerebro y en células inmunes y es mediada por la acción de una PLC selectiva capaz de producir moléculas de fosfo-amida, las cuales padecerán una posterior desfosforilación para dar lugar a la anandamida libre (Maccarrone, 2017).

Por lo que respecta al 2-AG, su síntesis se da a partir de fosfolípidos de membrana que presentan ácido araquidónico, principalmente, el PIP₂. Gran parte del 2-AG se genera

mediante la hidrólisis del PIP₂ catalizada por la PLCβ (Figura 7). El diacilglicerol resultante será procesado por la diacilglicerol lipasa (DAGL) dando lugar finalmente al 2-AG. Se han descrito dos isoformas de la DAGL: α y β. Se ha observado que la DAGLα es la principal productora de 2-AG a nivel del SNC. Mientras que la DAGLβ presenta mayor actividad en fenómenos de *autapse* o autosinápsis, sinapsis que genera una neurona sobre ella misma, (Jain et al., 2013), y especialmente en la producción de 2-AG en células inmunes. Se ha descrito que la activación de ciertos receptores capaces de promover la función PLC como son los receptores muscarínicos, de orexina o los metabotrópicos de glutamato, puede estimular la producción de 2-AG. Además, las funciones de los eCB, no se encuentran limitadas al SEC, el 2-AG es, por ejemplo, un intermediario metabólico en la síntesis de lípidos, con un rol imprescindible en la síntesis de prostaglandinas.

Por otro lado, también se han descrito múltiples vías de degradación de los eCB (Hillard, 2018)(Figura 7). En el caso de la AEA, a nivel del SNC, se ha descrito que su principal vía de degradación es mediada por la acción de la amida-hidrolasa de ácidos grasos (FAAH). Otra vía descrita es la dependiente de la oxidación inducida por los inhibidores de ciclooxigenasa 2 (COX-2), la cual no parece tener una relación directa con las acciones derivadas de los CBR (Hu, Bradshaw, Chen, Tan, & Walker, 2008). El catabolismo del 2-AG se produce mediante la acción de las enzimas monoacilglicerol lipasa (MAGL) y las hidrolasas de dominio alfa/beta 6 y 12 (Blankman et al., 2007). La MAGL se expresa en tejidos periféricos como el hígado y el corazón, y en múltiples regiones del SNC (Long et al., 2009), pero presenta una mayor concentración en los terminales sinápticos. A nivel terapéutico, el uso de los enzimas del SEC como diana farmacológica genera gran interés, especialmente en tratamientos enfocados a enfermedades o trastornos del SNC. La actividad del enzima FAAH, por ejemplo, se ha demostrado que puede ser inhibida mediante el uso de Propofol, anestésico general de uso común, lo cual conlleva a un aumento de la concentración de AEA en SNC (Patel et al., 2003). También se ha descrito que la implicación de la MAGL en procesos neuroinflamatorios, promoviendo la conversión del 2-AG a prostaglandinas proinflamatorias (Viader et al., 2015).

Una de las características del SEC es su funcionalidad retrograda, es decir, los endocannabinoides son sintetizados en respuesta a diferentes estímulos, a partir de componentes de la membrana postsináptica, que son liberados al espacio sináptico y se unen a los receptores de la membrana presináptica. El receptor CB₁, a nivel presináptico ejerce un papel inhibitorio de la liberación de neurotransmisores, mediado por el influjo de calcio (C.-Y. Chen et al., 2010; Kano et al., 2009; Kibret et al., 2023). Esta función se define como una forma de plasticidad sináptica a corto plazo, que regula la función sináptica. La inhibición sobre la neurotransmisión, a su vez, a nivel del terminal postsináptico, es capaz de regular la síntesis de eCB, dado que es en estas porciones es donde se hayan los enzimas de síntesis, introducidos anteriormente. (Kano et al., 2009; Safo et al., 2006). De todos modos, se ha descrito también una acción no retrograda de los eCB, los cuales pueden actuar en el propio terminal postsináptico. Por ejemplo, activando procesos de depresión a largo plazo mediados por TRPV1 o reduciendo la excitabilidad del terminal por la hiperpolarización dependiente de la activación del CB₁R postsináptico (Castillo et al., 2012).

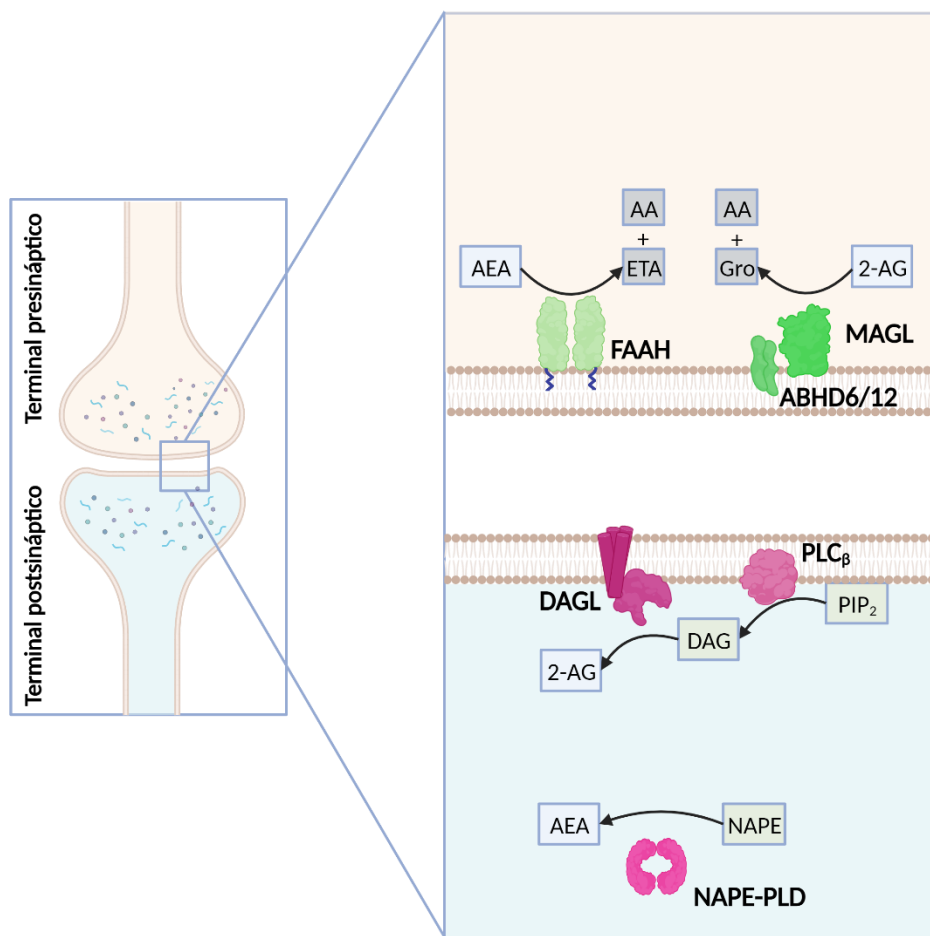


Figura 7. Naturaleza retrograda del sistema endocannabinoide. Enzimas de síntesis y degradación en los terminales sinápticos. [Abreviaturas en figura: Anandamida (AEA), Ácido araquidónico (AA), Etanol amida (ETA), Amida-hidrolasa de ácidos grasos (FAAH), 2-araquidonoiletanolamida (2-AG), Glicerol (Gro), Monoacilglicerol lipasa (MAGL), Hidrolasa del dominio α/β (ABHD), Diacilglicerol lipasa (DAGL), Fosfolipasa C (PLC), Fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂), Diacilglicerol (DAG), N-acil-fosfatidiletanolamina (NAPE), N-acil-fosfatidiletanolamina fosfolipasa D (NAPE-PLD)]

Actualmente, el cánnabis supone la droga de consumo ilegal más utilizada en Europa. Aunque se están realizando numerosos estudios con los compuestos cannabinoides, su legalidad tanto a nivel de consumo propio recreacional como médico tan solo se da, dentro de la comunidad europea, en Malta desde finales del año 2021. Sin embargo, diferentes países han iniciado el proceso de legalización para el uso clínico de compuestos cannabinoides en los últimos años, entre ellos España. Aunque los avances en términos de prescripción y formulación siguen sin estar establecidos dentro del marco legal (United Nations Office on Drugs and Crime, 2022), los estudios sobre los efectos beneficiosos de los compuestos cannabinoides son cada vez más numerosos y prometedores en diversos contextos patológicos.

1.3.1. Los Compuestos cannabinoides

Los compuestos cannabinoides se caracterizan por ser moléculas liposolubles, los cuales se pueden categorizar en función de su origen en: fitocannabinoides o compuestos extraídos

de la especie *Cannabis sativa*; endocannabinoides o compuestos generados por el propio individuo y, cannabinoides sintéticos o formulaciones obtenidas a nivel de laboratorio.

Dentro de los fitocannabinoides más estudiados destacan el Δ^9 -Tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC), el Δ^8 -Tetrahidrocannabinol (Δ^8 -THC), el cannabidiol (CBD) y el cannabinol (CBN). Aun siendo el Δ^9 -THC y el CBD los compuestos más abundantes de la planta del cánnabis, se han llegado a aislar más de 500 compuestos, con menor concentración y una actividad farmacológica propia (Boggs et al., 2018; Radwan et al., 2021). El CBN fue el primer compuesto fitocannabinoides aislado, seguido poco después por el CBD (Wood et al., 1896). En 1942 se aislaron el Δ^9 -THC fue extraído en una mezcla con Δ^8 -THC. Y no fue hasta 1964 cuando se obtuvo el compuesto aislado individualmente (Gaoni & Mechoulam, 1964; Wollner et al., 1942).

El potencial terapéutico de los fCB se encuentra extensamente documentado. Las principales acciones descritas asociadas al Δ^9 -THC son: un efecto psicoactivo, la reducción de la presión intraocular, la actividad antimicrobiana o su capacidad como antiemético o su capacidad analgésica (Chang et al., 1979; Colasanti, 1990; Elsohly et al., 1982; X.-F. Wang et al., 2020). El Δ^8 -THC, análogo del Δ^9 -THC con un doble enlace en la 8ª cadena de carbono, también presenta efectos psicotrópicos, aunque menos potentes que los descritos mediante la activación del Δ^9 -THC. El receptor cannabinoide CB₁ es el principal responsable de los efectos psicotrópicos inducidos por los cannabinoides. Aunque el Δ^9 -THC también es capaz de actuar como agonista parcial del CB₂R (R.G. Pertwee, 2008). Dados los efectos beneficiosos inducidos por los cannabinoides, aquellos compuestos que no ejercen un efecto psicoactivo se han posicionado en el foco de la investigación biomédica. Un claro ejemplo es el CBD, que dependiendo de la concentración puede actuar como modulador alostérico negativo de los CB₁R y CB₂R, si se encuentra a bajas concentraciones. Y actúa como agonista uniéndose al centro ortostérico si se haya a concentraciones elevadas, mostrando una dualidad que genera gran interés farmacológico (Navarro et al., 2021). Entre las acciones inducidas por el CBD destacan las actividades antiinflamatorias e inmunomoduladoras. A nivel del SNC, se encuentra implicado en actividades anticonvulsivas, antioxidantes y ansiolíticas, e incluso, se ha determinado su actividad antipsicótica, la cual se postula deriva de la implicación del SEC en la regulación del sistema dopaminérgico en diversas áreas del cerebro (Batalla et al., 2019; de Mello Schier et al., 2014; Gunasekera et al., 2022).

La mayoría de los estudios y formulaciones aplicadas utilizan los fitocannabinoides en forma neutra, aunque en la planta *Cannabis sativa* son sintetizados inicialmente en su forma ácida. Esta forma es muy inestable y en contacto con el oxígeno sufre una rápida descarboxilación adquiriendo la forma neutra (Figura 8). El ácido olivetólico se convierte en ácido cannabigerólico (CBGA), mediante la adición de pirofosfato de geranilo. El CBGA dará lugar a las formas ácidas mencionadas que darán lugar al THC y el CBD, entre otros. Cuando es el ácido divarínico que reacciona con el pirofosfato de geranilo, se genera la forma ácida de la cannabigerovarina (CBGVA), el procesamiento de la cual dará lugar a las formas varínicas CBDV y THCV. (Gagne et al., 2012; Gülck & Møller, 2020; Thakur et al., 2005). Se ha descrito que el THCV es capaz de reducir la producción de citoquinas proinflamatorias mediante su unión como agonista parcial al CB₂R, mostrando gran potencial en procesos isquémicos (Bátkai et al., 2012). En el caso del CB₁R, el THCV actúa como un antagonista, por lo que se le asocian acciones antipsicóticas (Cascio et al., 2015). Así mismo, en modelos de obesidad inducidos por dieta y transgénicos deficientes en la hormona leptina (ob/ob) se ha observado que el tratamiento con THCV mejora la sensibilidad a la insulina, así como mejora de otros parámetros en pacientes de diabetes tipo II. Por ejemplo: reduciendo la glucemia en ayunas, o incrementando la concentración de adiponectina en sangre,

relacionada con la sensibilidad hepática a la insulina (Jadoon et al., 2016; Wargent et al., 2013). El THCA ejerce su capacidad neuroprotectora en modelos animales de la enfermedad de Huntington (EH) y de EP, mediante la unión a PPAR γ (Nadal et al., 2017; Valdeolivas et al., 2015). El CBDV, por otro lado, se asocia con funciones antiinflamatorias, con gran potencial en el tratamiento del acné, en episodios de inflamación propios de la Colitis ulcerosa, o en procesos de neuroinflamación en modelos animales de desorden del espectro autista, inducidos por exposición prenatal a ácido valproico (Oláh et al., 2016; Pagano et al., 2019; Zamberletti et al., 2019).

Los endocannabinoides más estudiados son la AEA y el 2-AG, y su síntesis se encuentra extendida a múltiples tejidos y órganos, entre otros, destacan el cerebro, el músculo, las células circulantes y el tejido adiposo. La acción de los endocannabinoides en la ingesta, así como en el ciclo energético del organismo despiertan gran interés para el tratamiento de trastornos metabólicos (Di Marzo et al., 2011). En diversos estudios se ha descrito una relación entre el aumento de AEA circulante con la ingesta propia de la homeostasis orgánica. Mientras que el aumento de 2-AG se relaciona con la activación del sistema de recompensa cerebral (De Luca et al., 2012). Se ha observado que el bloqueo del CB $_1$ R es capaz de mejorar la resistencia a la insulina en modelos animales transgénicos CB $_1$ R(-/-) obesos (J. Liu et al., 2012). Al presentar CB $_1$ R actividad promotora del almacenaje energético, toma relevancia el estudio de los endocannabinoides en afectaciones donde se da una desregulación en este proceso como son la obesidad, la diabetes tipo II o síndrome metabólico.

Otro contexto en el que se observa un incremento en los niveles de eCB circulantes es en procesos inflamatorios (Fernández-Rodríguez et al., 2004; Y. Wang et al., 2001). La actividad del receptor CB $_2$, expresado en células T y B, así como en macrófagos y neutrófilos, se asocia a la disminución de la síntesis de citoquinas proinflamatorias (Patsenker et al., 2015). Se ha descrito que la expresión del receptor CB $_2$ en células inmunes aumenta frente a estímulos lesivos. Se ha descrito que la activación de la respuesta inmune mediante presentación de antígeno de macrófagos y células dendríticas conlleva a un aumento del 2-AG circulante, y por tanto de la activación de CB $_2$ R (Dotsey et al., 2017).

Trastornos neurológicos, como son los asociados a la ansiedad, el sistema de recompensa y la cognición se encuentran influenciados también por el SEC. Por ejemplo, individuos que presentan mutaciones que conllevan un aumento de la AEA circulante presentan una recuperación más rápida ante situaciones de ansiedad (Spagnolo et al., 2016). En pacientes diagnosticados con trastorno de estrés postraumático se ha observado una disminución en las concentraciones de 2-AG (Schaefer et al., 2014).

Compuestos cannabinoides han demostrado gran potencial terapéutico y la formulación de algunos de ellos ha sido aprobada tanto por la FDA como por la Agencia Europea del Medicamento (EMA). Por un lado, algunos de estos medicamentos contienen fCB naturales, como son: el Epidiolex®, primer medicamento derivado del cánnabis aprobado, que consiste en un extracto de CBD purificado, que se prescribe en casos severos de epilepsia; y el Sativex®, formulado con una mezcla a partes iguales de Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) y CBD, que se receta a pacientes con esclerosis múltiple (EM). El resto de los medicamentos con compuestos cannabinoides se formulan en base a estructuras sintéticas. Un ejemplo es el Marinol® o el Syndros®, medicamentos antieméticos asociados a tratamientos de quimioterapia, que consisten en un producto sintético mímico del Δ^9 -THC denominado Nabilona. Mencionar también el Cesamet™, con similar prescripción médica, que se formula con otro compuesto sintético mímico del Δ^9 -THC denominado Dronabinol.

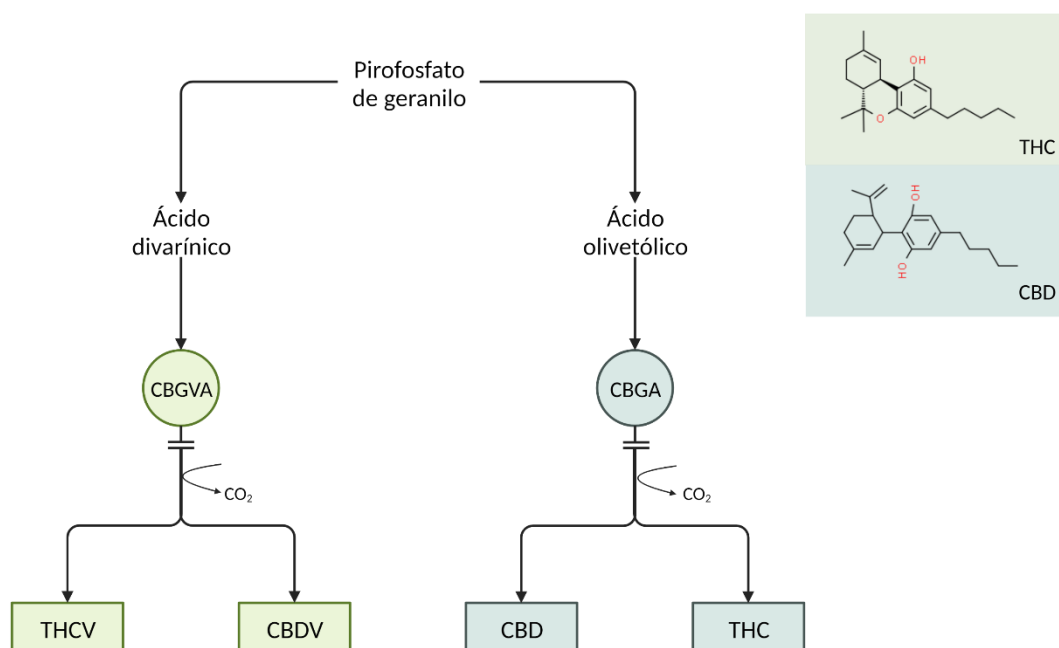


Figura 8. Compuestos fitocannabinoides. Vías de síntesis de las formas varínicas y neutras. Estructura de los fitocannabinoides más abundantes en *Cannabis sativa*: Δ^9 -THC y CBD. [Abreviaturas en figura: Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC), Tetrahidrocannabivarina (THCV), Ácido cannabigerovarínico (CBGVA), Ácido cannabigerólico (CBGA), Cannabidiol (CBD), Cannabidivarin (CBDV)]

El creciente conocimiento sobre la estructura de los cannabinoides naturales, así como de los lugares de unión ortostéricos y alostéricos a los receptores de cannabinoides, permite avanzar en el diseño de nuevos cannabinoides sintéticos. Mejoras en la eficiencia y la afinidad de los compuestos, junto con los fenómenos descritos de agonismo sesgado, abren una puerta a la síntesis dirigida, ampliando las posibilidades en el mercado farmacológico.

1.3.2. Receptor de cannabinoides 1 (CB₁R)

El receptor de cannabinoides 1 (CB₁R), codificado por el gen *CNR1*, es uno de los receptores más ubicuos del organismo. Presenta niveles elevados de expresión en los adipocitos del tejido adiposo blanco, en la glándula pituitaria y en el SNC. De hecho, es el receptor de membrana más abundante del SNC (Mackie, 2008). El CB₁R se considera una importante diana terapéutica dada su interacción y capacidad de modulación una gran cantidad de procesos, como son: el apetito, la locomoción, el dolor o el estado anímico (Laprairie et al., 2017). Por otro lado, al receptor de cannabinoides CB₂, se expresa principalmente en células del sistema inmune, y se le asocian funciones moduladoras sobre procesos inmunológicos, como es la inflamación (Turcotte et al., 2016). Hay que mencionar que los receptores cannabinoides presentan una elevada actividad constitutiva, sobre todo el CB₁R, que hay que considerar en la caracterización del rol del sistema SEC en los diferentes tejidos (Roger G Pertwee, 2005).

CB₁R pertenece a la clase A de los GPCR, el cual de manera canónica se acopla a proteína G_{ai}, inhibiendo la acción de la AC. En casos muy concretos puede acoplar otras proteínas heterotriméricas como la proteína G_{ao}, con acción sobre cascadas dependientes de PLC, o la proteína G_{as} en muestras de globo pálido. Este cambio de acoplamiento a proteína G se asocia a la presencia y actividad de otros receptores capaces de modular la señalización de

CB₁R (Abood et al., 2019; Jarrahan et al., 2004; Maneuf & Brotchie, 1997). La activación de la vía de señalización de las MAPK por parte de CB₁R ha sido determinada en gran cantidad de sistemas de expresión endógenos y heterólogos. Así mismo, su capacidad para activar las vías JNK y p38 también ha sido descrita en sistema de expresión heteróloga y cultivos primarios de hepatocitos (Chanda et al., 2011; Han et al., 2017; Rueda et al., 2000).

La desensibilización de los receptores CB₁ en membrana plasmática se da rápidamente tras la activación dependiente de ligando mediante la acción de las GRK y las β -arrestinas. Este proceso, se ha propuesto no solo como un sistema de reciclaje y control de la señal, sino también como un sistema de tráfico del receptor entre diferentes compartimentos celulares o diferentes segmentos de la membrana celular (Leterrier et al., 2006; McDonald et al., 2007). La capacidad del CB₁ para interactuar con gran cantidad de efectores celulares es otra de las características del CB₁R que le otorga gran potencial terapéutico. También se ha descrito el fenómeno de agonismo sesgado asociado al receptor *in vivo* mediante diversos agonistas para generar diferentes efectos (Grim et al., 2016; Nguyen et al., 2012). El agonismo sesgado sobre CB₁R, se produce al unirse un agonista que estabiliza la forma del receptor favoreciendo la unión de este a un efector de manera preferencial. Se ha demostrado como agonistas sesgados por la vía dependiente de proteína G $_{\alpha i}$ y G $_{\beta \gamma}$ son capaces de aumentar los niveles de expresión de CB₁R, promoviendo la viabilidad celular en líneas celulares modelo de la EH con relevantes mutaciones en el gen de la huntingtina (Laprairie et al., 2016). Y, de manera contraria, los agonistas sesgados por la vía del reclutamiento de β -arrestina-1, reducen los niveles de CB₁R, incidiendo negativamente en la viabilidad celular. Por lo que el constante estudio sobre las vías de señalización y sus efectos a nivel fisiopatológico son de gran relevancia.

A nivel del SNC, el receptor CB₁, ha sido descrito no solo como modulador de la actividad neuronal, pero también como regulador de la proliferación y diferenciación temprana. Se ha observado que en la decimocuarta semana de gestación en humanos, aparece un pico en los niveles de mRNA de los receptores CB₁ y CB₂ (Biegon & Kerman, 2001). Recientemente, se ha descrito como el SEC se encuentra implicado en la diferenciación celular mediante la activación de vías de señalización que promueven la supervivencia y proliferación de progenitores neurales, como es la de las ERK (García-Arencibia & Molina-Holgado, 2019).

El CB₁R relaciona con la regulación del sistema de recompensa y el control del apetito mediante el conocido efecto orexigénico derivado del consumo de cannabis. Convirtiéndose en una diana en múltiples trastornos de tipo metabólico o desórdenes alimenticios como son la anorexia o la obesidad (Pagotto et al., 2006). En modelos animales que carecen del CB₁R (CB₁R^{-/-}) se han observado disminuciones significativas en la ingesta calórica, así como en el peso corporal. Este proceso se asocia principalmente a la capacidad moduladora que CB₁R ejerce a nivel del hipotálamo (Busquets-García et al., 2015). Este núcleo se caracteriza por ser la región cerebral encargada de regular procesos vitales como el ritmo cardíaco, la temperatura corporal o la ingesta. Es más, en modelos CB₁R^{-/-} y ante la inhibición del receptor CB₁ se ve bloqueado el efecto orexigénico inducido por la ghrelina (Kola et al., 2008). De hecho, un antagonista selectivo de CB₁R, el rimonabant, fue propuesto y comercializado como medicamento para el tratamiento de la obesidad. El medicamento Acomplia® con rimonabant como principio activo fue retirado del mercado por la Agencia Española de Medicamentos y productos sanitarios dos años más tarde, debido a los efectos secundarios de carácter psiquiátrico, entre los cuales se incluían trastornos depresivos y pensamientos suicidas.

Otras implicaciones a nivel psiquiátrico del CB₁R se centran en su potencial neuroprotector en el contexto de diversas enfermedades neurodegenerativas como son la EA o la EP. Cabe

mencionar, que no tan solo el CB₁R juega un rol neuroprotector, el CB₂R o receptores no con afinidad por los compuestos cannabinoides también ejercen este efecto ,como es el caso de PPAR γ en la EP. Se ha descrito como uno de los efectos secundarios del tratamiento con L-DOPA, más concretamente en casos de discinesia, es la alteración en la expresión del receptor CB₁, así como de los enzimas de producción y degradación de los compuestos eCB (Rojo-Bustamante et al., 2018). Un metaanálisis basado en el dolor asociado a la EP ha presentado que el uso de cannabinoides, al igual que el de opioides, resulta en una disminución de dicho dolor (Qureshi et al., 2018). Abriendo así múltiples consideraciones sobre el uso de cannabinoides en el tratamiento paliativo de la EP. Se ha utilizado el *screening* fenotípico para demostrar la eficacia de ciertos cannabinoides que se unen a CB₁R en el contexto fisiopatológico de la EA (Schubert et al., 2019). En modelos transgénicos de la EA de rápido deterioro cognitivo se ha descrito como la desensibilización de CB₁R mejora síntomas neuropsiquiátricos como la agitación, caracterizada por la ansiedad e inquietud (Outen et al., 2021). En algunos estudios preclínicos, se ha observado que la activación de CB₁R conlleva la hiperpolarización de la membrana neuronal, modulando la liberación de, no solo neurotransmisores, sino también de citoquinas. Considerándose, por tanto, el aumento de la expresión de CB₁R en EA como una respuesta compensatoria a la excitotoxicidad, con capacidad neuroprotectora y antiinflamatoria (Outen et al., 2021). Ciertos efectos anti-apoptóticos asociados al 2-AG son mediados por su unión a CB₁R, como por ejemplo la inhibición de la enzima COX-2, de gran relevancia en procesos neuroinflamatorios (X. Chen et al., 2011; J. Zhang & Chen, 2008).

La actividad de CB₁R, pero, presenta cierta controversia a la hora de plantear posibles tratamientos clínicos. En modelos animales, así como en muestras post-mortem de pacientes de ataxia espino-cerebelar se ha observado una sobreexpresión de CB₁R en ciertas subpoblaciones neuronales (Gómez-Ruiz et al., 2019). En el modelo SCA-3, se demostró como el bloqueo de la actividad de CB₁R mejora síntomas de la ataxia como la descoordinación motora (Gómez-Ruiz et al., 2019). Aunque, de manera contraria, en el modelo animal de ataxia denominado *ducky*, estudios han demostrado mejoras en signos propios de la enfermedad al promover la acción de CB₁R (X. Wang et al., 2013). Otra aproximación terapéutica es el bloqueo de los enzimas que degradan los eCB. Por ejemplo, en modelos animales de la EH, se ha demostrado como la inhibición de la MAGL reduce la inflamación y progreso del infarto en casos de isquemia cerebral (S.-H. Choi et al., 2018; Ruiz-Calvo et al., 2019).

La formación de heterómeros compuestos por el CB₁R y sus implicaciones fisiopatológicas han tomado gran relevancia a nivel farmacológico. Un ejemplo es el complejo heteromérico formado por CB₁R y CB₂R. En modelos animales de EA, el heterómero CB₁R-CB₂R se ha asociado con la activación de microglía en hipocampo. Así como, en la activación de microglía de estriado en modelos de EP. También se conoce su relación con la discinesia asociada a los tratamientos con L-DOPA (Callén et al., 2012; Navarro, Borroto-Escuela, et al., 2018). El receptor CB₁, también es capaz de constituir heterómeros con otros receptores no cannabinoides, como, por ejemplo, el complejo CB₁R-GPR55. En el cual se observa la inhibición de GPR55 mediante la presencia de CB₁R (Kargl et al., 2012). Otro ejemplo es el complejo con el receptor de serotonina 5HT_{2A}R. El heterómero CB₁R-5HT_{2A}R se ha demostrado media el efecto producido por la administración de Δ^9 -THC sobre el deterioro de la memoria, entre otras deficiencias cognitivas (Viñals et al., 2015).

1.4. Esclerosis múltiple

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad autoinmune inflamatoria de carácter multifocal que afecta al SNC. Su aparición temprana y el proceso neurodegenerativo que se desarrolla la caracterizan como la primera causa mundial de discapacidad entre jóvenes adultos. La etiología de la EM se ha asociado a un conjunto de factores genéticos y ambientales que aumentan la susceptibilidad del individuo a su desarrollo. Este trastorno neurológico se inicia con un ataque del sistema inmune contra las vainas de mielina que recubren las prolongaciones axonales y va acompañado de un proceso inflamatorio, dando lugar a un inicio intermitente que finalizará con el deterioro neurológico (Höftberger & Lassmann, 2017).

Clásicamente, se asociaba el inicio de la EM con la alteración funcional de los linfocitos efectores Th1. Pero a medida que ha avanzado la investigación, se ha descrito que, en términos de susceptibilidad genética, hay otras células inmunológicas que presentan un papel relevante, como son: los linfocitos efectores Th17, los linfocitos T CD8⁺ o las células B (Kunkl et al., 2020). El factor genético más implicado con el desarrollo de la EM reside en el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), más concretamente, en las secciones identificadas como locus de clase II DR (DRB1*1501) y en el locus A en la región de clase I. De hecho, HLA-DRB1 se acepta ampliamente como uno de los locus susceptibles para el desarrollo de casos de EM familiar y esporádica (Mosca et al., 2017). De todos modos, existen diferentes loci fuera del MHC que han sido asociados a la predisposición genética de la EM, como son los genes que codifican para: los receptores de células T, la proteína básica de mielina, la inmunoglobulina o el factor necrótico tumoral (TNF). Los receptores de las interleucinas 7 (IL-7) y 2 (IL-2) también son proteínas involucradas, dado su rol crucial en la diferenciación y supervivencia de las células CD4⁺ y CD8⁺. Se han descrito incluso, genes mitocondriales asociados a la EM, como es el que codifica para la proteína desacoplante 2, miembro de la familia de transporte de protones mitocondrial (Vogler et al., 2005).

Ciertos factores ambientales también se han asociado con una mayor predisposición a padecer EM. Entre ellos destacan el tabaquismo, el déficit de vitamina D (Vit-D) y la infección por el virus de Epstein-Barr (Ascherio & Munger, 2014; Thacker et al., 2006). De hecho, un reciente análisis longitudinal realizado en una cohorte de más de 10 millones de jóvenes adultos sugiere que la seroconversión derivada de la infección del herpesvirus podría ser la causa del desarrollo de la enfermedad (Bjornevik et al., 2022).

Como ya se ha mencionado, la EM constituye la primera causa de incapacidad en jóvenes adultos. En las etapas iniciales de la enfermedad, no se observa neurodegeneración, pero en estadios progresivos esta aumenta. Gran parte de los pacientes padecen periodos de remisión entre relapsos. Durante estos periodos de remisión, los síntomas generados o agravados por el relapso se mantienen, aumentando así de manera escalonada la discapacidad del individuo. Dependiendo del patrón clínico de la enfermedad, y por lo tanto de los estadios de relapso/remisión, se determinan cuatro tipos de EM: el vaso clínico aislado (CCA), la EM recurrente remitente (EMRR), la EM de progresiva primaria (EMPP) y la EM de progresión secundaria (EMPS). Existen algunas formas clínicas fuera de esta clasificación de las formas de EM (Traboulsee et al., 2016). Entre ellos, la EM benigna, la cual cursa con un bajo número de ataques con consecuencias leves que no afectan a la funcionalidad del tejido nervioso (Lublin & Reingold, 1996).

El caso clínico aislado (CCA), se caracteriza por la presencia de ataques con uno o múltiples focos, que desencadenan a una resolución parcial o completa. Son casos poco comunes, ya que habitualmente progresan a otras formas de EM.

La esclerosis múltiple recurrente remitente (RREM), es la forma más habitual de EM, con el 85% de los casos del total. Se manifiesta inicialmente con síntomas visuales y sensoriales, como son la visión borrosa o doble, el vértigo, la fatiga o la sensación de entumecimiento de las extremidades y los ataques pueden llegar a durar de días a meses. Se caracteriza por la presencia de ataques definidos que cursan con la aparición de nuevos síntomas neurológicos o un aumento en la severidad de los ya experimentados, seguidos de periodos de remisión. Durante estas remisiones, que pueden abarcar de meses a años, los síntomas pueden o no desaparecer, aunque el daño neurológico es permanente.

La esclerosis múltiple progresiva primaria (EMPP) se caracteriza por la ausencia de ataques definidos. Presenta, aun así, una evolución progresiva, lenta y continua de la aparición y severidad de los síntomas. Acumulando déficits neurológicos y un aumento en la discapacidad que puede extenderse de meses a años. Corresponde al 10% de los pacientes diagnosticados con EM (Ebers, 2004).

La esclerosis múltiple progresiva secundaria (EMPS) se caracteriza por la pérdida de los periodos de relapso/remisión y se adquiere un deterioro progresivo similar al de la EMPP, desarrollando lentamente una pérdida general de la funcionalidad. Es la forma avanzada de la EMRR. Aproximadamente el 50% de los pacientes de EMRR acabarán por desarrollar esta forma progresiva (Miller et al., 2000).

En todas las formas de EM, así como en todos los estadios de estas, se observa cierto grado de inflamación crónica. Secuela con gran relevancia en el desarrollo y la severidad de la enfermedad, especialmente en el inicio del proceso neurodegenerativo que aparece en el SNC. La inflamación crónica se origina por la activación de las respuestas innata y adaptativa del sistema inmunológico. Por lo tanto, intervienen gran cantidad y diversidad de células SNC. Por un lado, la respuesta adaptativa será liderada por los linfocitos T. Estos son los encargados de la degradación de la mielina, que resulta en la disminución de la transmisión axonal, y eventualmente la muerte celular. No siendo, pero, las únicas células reclutadas al SNC desde la periferia. Por otro lado, la respuesta innata será orquestada por macrófagos residentes, por la microglía y la astrogliá (Figura 9)(Mayo et al., 2012).

El reclutamiento de células inmunes es uno de los procesos cruciales en el desarrollo de la neuroinflamación y por tanto de la progresión de la EM. En muestras *post-mortem* de pacientes de EM se ha observado una pérdida de la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE) de carácter crónico, evidenciando la elevada tasa de reclutamiento de leucocitos (Kirk et al., 2003). Diferentes estudios han descubierto un sistema linfático rudimentario en el SNC asociado a los senos venosos, que permite la migración de células dendríticas y cierto tipo de células T, para llevar a cabo la presentación de antígeno a los nódulos linfáticos cervicales (Louveau et al., 2018). La mayoría de los linfocitos T reclutados al foco inflamatorio presentan un fenotipo activado o citotóxico, y tienen, presumiblemente una vida media reducida. Pero, se ha descrito como parte de estos linfocitos son capaces de convertirse a células T de memoria, que residirán en el tejido por un tiempo prolongado (Machado-Santos et al., 2018) (Figura 9). Estos linfocitos T, ante un estímulo inflamatorio, se diferencian a linfocitos citotóxicos. Así mismo, se ha descrito la presencia de células B con capacidad de diferenciación a células plasmáticas en el parénquima cerebral de pacientes con EM (Wicken et al., 2018). Se sugiere que estos leucocitos residentes son capaces, por tanto, de iniciar un nuevo foco inflamatorio cuando el tejido previamente dañado exponga los antígenos adecuados para su activación.

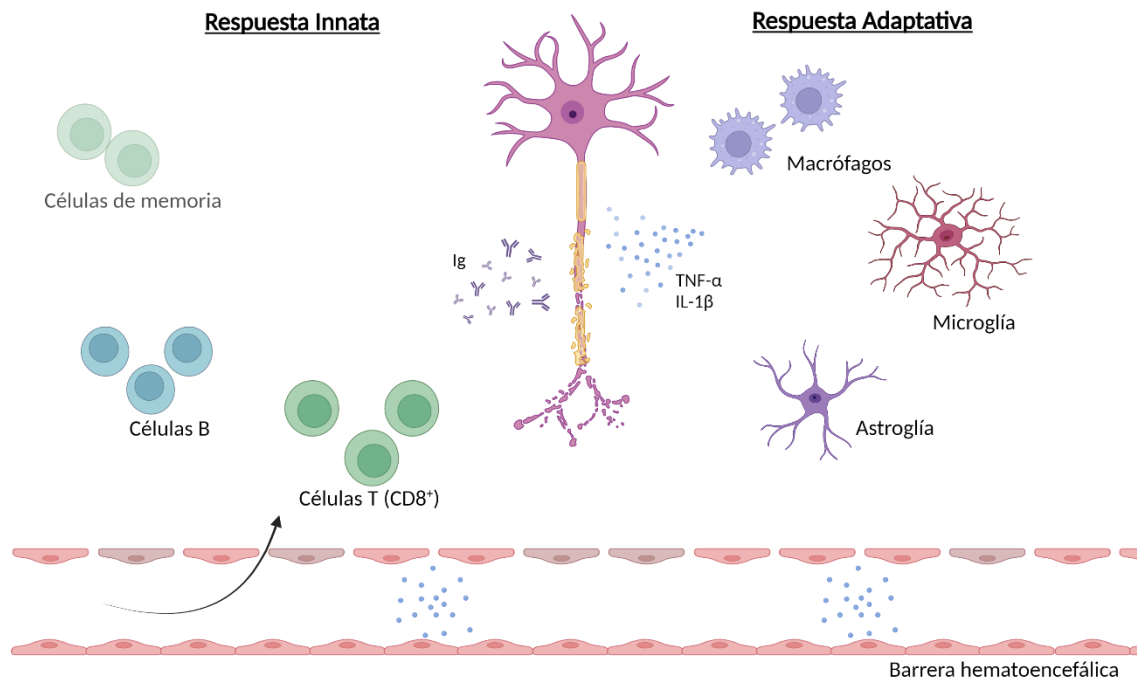


Figura 9. Esquema de las principales implicaciones de la respuesta inmune innata y adaptativa en el desarrollo y progreso de la esclerosis múltiple. [Abreviaturas en figura: Factor necrótico tumoral α (TNF- α), Interleucina 1 β (IL-1 β)]

Fisiopatológicamente, el estudio del desarrollo de las lesiones de la EM se limitaba a la materia blanca. Sin embargo, se ha descrito que la materia gris, especialmente en la región cortical también se ve afectada por la enfermedad (Kutzelnigg & Lassmann, 2005). De hecho, se ha demostrado la capacidad de las células B meníngeas para formar agregados ectópicos de tipo linfóide. Estos agregados se asocian a la desmielinización cortical inflamatoria y al proceso neurodegenerativo de la materia gris cortical en la EM, con una mayor agresividad de la enfermedad. Mediante autopsia, se ha observado que el 40% de pacientes con EMPS presentan estos agregados linfoides de células B (Howell et al., 2011).

Las lesiones propias de la EM se clasifican en función de la extensión de la inflamación, así como por el grado de desmielinización (Kuhlmann et al., 2017; Matthews, 2019). Una lesión se considera activa cuando el proceso de desmielinización está activo. En este caso, los macrófagos y la microglía se extienden por toda la zona afectada. Una lesión mixta (activa-inactiva) es aquella que en su parte central o bien presenta una desmielinización focalizada o un proceso activo de remielinización, y por tanto se observa la presencia de finas capas de mielina. En este tipo de lesión, gran parte de los macrófagos y microglía se encuentran en la periferia de la lesión. En la lesión mixta, el fenotipo dominante de los macrófagos involucrados es proinflamatorio (Reynolds et al., 2011). Mientras que la microglía que se encuentra a la parte central de la lesión presenta un fenotipo antiinflamatorio (M2) con actividad asociada al proceso activo de remielinización (Miron et al., 2013).

Otro tipo celular que toma un rol crucial en el desarrollo lesivo de la EM es la astrocglía. Sus funciones se hallan altamente correlacionadas con las de la microglía, y se ven incrementadas en las lesiones de tipo mixto (Liddel & Barres, 2017).

1.4.1. Epidemiología y diagnóstico de la Esclerosis Múltiple

En 2020 se estimó que a nivel mundial aproximadamente 2,8 millones de personas padecían EM. Siendo la prevalencia global de la enfermedad de 35,9 por cada 100.000 habitantes (Walton et al., 2020). Según la información compilada por la federación internacional de la esclerosis múltiple, esta prevalencia ha incrementado un 30% desde el año 2013, con un porcentaje menor al 20% de países que han experimentado una disminución o un mantenimiento en sus valores. De manera global, las mujeres presentan una probabilidad dos veces mayor de padecer la enfermedad.

Epidemiológicamente, se ha observado que la edad tiene una relación directa con un incremento en la incidencia de las formas progresivas, así como en la severidad de la enfermedad. Este hecho se asocia con los cambios intrínsecos de la regulación del sistema inmune debidos a la edad, como el aumento en la activación con carácter proinflamatorio de la microglía (Zrzavy et al., 2018).

Las manifestaciones clínicas de la EM son muy diversas, ya que la afectación funcional depende de las áreas lesionadas del SNC. El diagnóstico de este trastorno, por tanto, supone un proceso complejo que hoy en día se basa en criterios clínicos de exclusión y análisis radiográficos. Entre las pruebas habituales se encuentran: la punción lumbar, para examinar ciertas anormalidades en anticuerpos relevantes, o los análisis sanguíneos para descartar afectaciones con sintomatología similar, como la enfermedad de Lyme. nivel radiográfico, el uso de la imagen por resonancia magnética (MRI) para la identificación de lesiones es el último criterio de confirmación. Otra técnica de imagen que se plantea clínicamente en el diagnóstico de la EM es el PET, usando radioligandos asociados a microglía y astrogliá para la identificación de focos lesivos inflamatorios, difícilmente detectables mediante MRI (Banati et al., 2000; Datta et al., 2017).

En el ámbito clínico, no existe actualmente un tratamiento definitivo para la EM. Así, se utilizan diversos enfoques para el tratamiento de la enfermedad, basados en modular los periodos de relapso, acelerando su recuperación y reduciendo su recurrencia, a la vez que se intenta ralentizar el avance de la sintomatología. Por un lado, para el tratamiento de los relapsos, es común el uso de corticoides, como la prednisona, para reducir la inflamación nerviosa. Como terapia de segunda línea se llevan a cabo plasmaféresis. La plasmaféresis es un técnica que permite la filtración del plasma sanguíneo para su recambio, eliminando, entre otros, los anticuerpos resultantes de la reacción autoinmune propia de la EM. Por otro lado, los tratamientos enfocados a la ralentización de la progresión de la enfermedad se conocen como terapias de modificación de la enfermedad (DMT). Por ejemplo: el ponesimod y la cladribina. Estos principios activos limitan el metabolismo y al división celular de linfocitos, limitando la capacidad de reparación del ADN (Comi et al., 2019). Otro ejemplos son el natalizumab o el alemtuzumab, que son anticuerpos monoclonales que impiden la infiltración de células inmunes a través de la BHE y bloquean la acción de linfocitos maduros, respectivamente. En último lugar, mencionar la importancia de la terapia física para el tratamiento de algunos síntomas. El fortalecimiento de músculos y el alivio de algunos signos sensoriales mediante fisioterapia, incrementa la calidad de vida de los pacientes (Motl & Pilutti, 2012).

1.4.1.1. Investigación actual

Los esfuerzos actuales de la investigación de la EM recaen en el diagnóstico temprano de la enfermedad, para minimizar mediante DMT la sintomatología y por lo tanto la severidad del trastorno, o paliar su progresión.

Actualmente, el diagnóstico de la EM se realiza mediante unas guías revisadas: los criterios de McDonald. Entre estos criterios destaca la detección de bandas oligoclonales específicas en el líquido cefalorraquídeo (LCR), la cual utiliza técnicas de inmunotransferencia o *western blot*. Aunque, hoy en día, este tipo de pruebas presentan una baja eficiencia a la hora del diagnóstico de la EM. Dado que la presencia de bandas oligoclonales, en primer lugar, se puede detectar en individuos que padezcan otras enfermedades neurológicas, y pueden no detectarse en todos los pacientes de EM. El desarrollo de nuevos criterios, basados en valores más fiables se encuentra bajo un estudio constante. Uno de los más prometedores se basa en la determinación de las cadenas ligeras libres de Kappa en el LCR (KLCCR), que se ven aumentadas en los enfermos de EM (Presslauer et al., 2008; Saadeh et al., 2022). Las células B generan cadenas ligeras y cadenas pesadas para la formación de inmunoglobulinas. Las KLCCR son un producto sobrante de esta formación que indica una activación anómala de la respuesta inmune. Importante mencionar que también se están evaluando técnicas que requieren de una integración a nivel informático, como son los análisis de proteómica y de transcriptómica para detectar nuevos marcadores. Las técnicas de *multiplexing*, se basan comparando en el estudio de los niveles de múltiples proteínas séricas y han demostrado una mayor precisión a la hora de determinar periodos de relapso (Gawde et al., 2022). El uso de secuenciación de RNA celular individual permite el estudio concreto de células presentes en serum o LCR, y la detección de diferencias relevantes en el fenotipo celular. Por ejemplo, la polarización de ciertas células B hacia un estado activo, se ha asociado con un proceso activo de EM (Ramesh et al., 2020).

Los tratamientos actuales para la EM se basan en la mejora de la sintomatología, ralentizando su progreso o minimizando el impacto de los relapsos. Teniendo en cuenta el carácter neurodegenerativo de la EM, el uso de células para promover el recambio celular se presenta como un potencial tratamiento con prometedores resultados a nivel de ensayo clínico. El ensayo clínico en fase I STEMS, realizado con un seguimiento mínimo de 96 semanas, evaluó la seguridad del uso de células precursoras neuronales en pacientes con formas progresivas de EM. La inyección intratecal de células precursoras neuronales demostró una menor atrofia cerebral en comparación con el grupo control (Genchi et al., 2023). Otro ensayo clínico prometedor en fase II, el S16.005, ha demostrado una correlación directa entre el tratamiento mediante inyección intratecal de células madre progenitoras mesenquimales y una respuesta terapéutica positiva en pacientes con formas progresivas de EM (Harris et al., 2021).

También se están estudiando nuevos tratamientos de la EM que se centran en factores ambientales. Por ejemplo, el estado nutricional, afecta la severidad de la EM. Algunos nutrientes presentan la capacidad de exacerbar o reducir la severidad de síntomas de la EM modulando la inflamación y la señalización REDOX (Riccio & Rossano, 2015). Un ejemplo claro de estos nutrientes o compuestos, son los polifenoles, como es el resveratrol, los cuales han demostrado tener efectos antioxidantes, antiinflamatorios y neuroprotectores (La Rosa et al., 2023). En el modelo animal de EM, CPZ, se ha observado que la administración de resveratrol es capaz de disminuir el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial e incluso, un inducir un incremento en la remielinización de las lesiones en la materia blanca (Ghaiad et al., 2017). Recientemente, se ha descrito mediante un ensayo clínico en fase III, que la suplementación con Vit-D 3 no es capaz de reducir EMRR la severidad o recurrencia de los relapsos en pacientes con EMRR (Cassard et al., 2023). Aunque el déficit de Vit-D se asocia con un riesgo más elevado a padecer EM (Munger et al., 2006).

1.4.2. El rol de la astrogía en la Esclerosis Múltiple

La progresión de la EM, así como su desarrollo secundario, se asocia principalmente a la activación con carácter crónico de las células del sistema inmunológico innato del SNC, entre las cuales destacan la microglía y la astrogía (Lassmann et al., 2012). Clásicamente, la actividad de la astrogía en la patología de la EM se creía limitada a la cicatrización, encapsulando el área una vez el proceso desmielinizante se da por finalizado. De hecho, las lesiones inactivas, son aquellas que presentan pocas o carecen de microglía y macrófagos activados, y, han iniciado este proceso de cicatrización. (Kuhlmann et al., 2017). Esta idea, pero, queda obsoleta al comprender ciertas acciones de los astrocitos en las etapas tempranas del desarrollo de la EM, donde juegan un papel importante en el reclutamiento de linfocitos y la exacerbación del daño tisular, y a su vez, confinando el foco inflamatorio y promoviendo la reparación tisular (Farina et al., 2007; Ponath et al., 2018).

Los astrocitos representan, aproximadamente, el 30% de las células gliales del SNC. Son cruciales para el mantenimiento fisiológico de las funciones del SNC, con un papel principal en la homeóstasis y el soporte metabólico neuronal (Masutani et al. 2004; Ransohoff & Brown, 2012; Sofroniew & Vinters, 2010). El concepto de sinapsis tripartita consiste en la consideración del terminal presináptico y el terminal postsináptico neuronales, pero también la terminación astrogial. El astrocito presente en cerebro sano facilita la correcta neurotransmisión, regulando los niveles de glutamato, lactato y antioxidantes, así como múltiples factores tróficos. Cabe destacar también, su capacidad para secretar citoquinas como son el TGF- β y la IL-10 de manera constitutiva, promoviendo un estado antiinflamatorio fisiológico (John et al., 2003)(Figura 10).

Los astrocitos SNC son capaces de activarse como parte de la respuesta inmune innata, pero también adaptativa, frente a estímulos propios de estrés oxidativo o químico. Su estimulación resulta en la secreción de citoquinas como son el TNF- α o la IL-6 y la producción de factores como es el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF). Los astrocitos reactivos, de manera análoga a las categorías fenotípicas utilizadas para la microglía, se diferencian en astrocitos A1 y A2 (Escartin et al., 2021; Liddel & Barres, 2017). El fenotipo astrogial A1, se caracteriza por presentar el marcador del componente 3 del complemento y se induce ante el proceso inflamatorio resultado de una lesión en el tejido. El fenotipo A2, se induce en procesos isquémicos y lesiones agudas del SNC, y se caracteriza por expresar una batería de factores neurotróficos. Ejerciendo funciones clásicamente asociadas a la neuroprotección. Al igual que en microglía, se sugiere que la astrogía no se limita a la dicotomía A1/A2, si no que puede presentar un amplio rango fenotípico.

Los astrocitos activados son capaces de producir una respuesta inflamatoria mediante el reclutamiento de leucocitos al SNC como defensa ante una lesión o agravio. Expresan moléculas de adhesión celular como la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) o la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) (S. J. Lee & Benveniste, 1999)(Figura 10). La respuesta proinflamatoria mediada por los astrocitos, puede ser modulada mediante neuroesteroides, como el estrógeno, sintetizado en el mismo SNC como modulador de la excitación neuronal (Schumacher et al., 2012). La estimulación de la astrogía mediante citoquinas proinflamatorias inhibe las funciones homeostáticas y de soporte neuronal. Resultando así, en una desregulación metabólica por falta de lactato y una falta de recaptación de glutamato, promoviendo la excitotoxicidad neuronal. En pacientes de EM se ha descrito una elevada concentración de glutamato en lesiones activas mediante la técnica de espectroscopia de resonancia magnética (MRS) (Srinivasan et al., 2005).

La implicación de los astrocitos en el desarrollo de las lesiones de la EM es cada vez más evidente. En lesiones activas, los astrocitos adquieren una morfología hipertrófica, con un incremento en el tamaño del soma y una modificación en la dirección de los procesos astrogliales. La hipertrofia astrogliar pronunciada es un fenómeno indicativo de daño tisular. En la EM se relaciona con la pérdida de oligodendrocitos, perturbando la red astrogliá-oligodendroglía (Brosnan & Raine, 2013). La retracción de los procesos astrogliales también supone una pérdida de la *glia limitans*, estructura constituida por una capa formada por prolongaciones astrogliales asociada a la lámina basal del parénquima del SNC. Su alteración afecta así, a la integridad de la BHE e incrementa el acceso al SNC de células inmunes periféricas.

En el modelo animal de encefalomiелitis autoinmune (EAE), inducida mediante la inmunización con péptidos derivados de la mielina o la transferencia de linfocitos T activados contra la mielina, se han observado astrocitos en las lesiones incipientes, es decir en las primeras fases de la formación de la lesión, significativamente antes de que se dé la infiltración celular en el parénquima cerebral (Pham et al., 2009). En lesiones de EM se ha descrito la expresión del MCH de clase dos y moléculas coestimuladoras en astrocitos. Así como una migración de los astrocitos a los márgenes de las lesiones activas que contienen restos de mielina (Traugott, 1987; Zeinstraet al., 2003). En estas condiciones, los astrocitos inducen la activación de las vías de señalización NFκB y la secreción de quimiocinas de reclutamiento de macrófagos, microglía y linfocitos (Kipp et al., 2009). En ratones del modelo EAE con una delección condicional del ligando 2 de quimiocina (CCL2) astrogliar se observó una menor severidad en etapas tardías de la enfermedad. Teniendo en cuenta que la función de la CCL2 es el reclutamiento de macrófagos y linfocitos T, esta mejora se atribuye a la menor infiltración y menor activación de células inmunes (Kim et al., 2014). En el modelo animal tratado con Cuprizona (CPZ), se ha identificado el reclutamiento temprano de la microglía por parte de los astrocitos como un factor beneficioso para la EM (Kipp et al., 2009; Skripuletz et al., 2013). Debido al retraso en el proceso de eliminación de los restos de mielina, impidiendo el proceso de remielinización y de diferenciación de los precursores de oligodendrocitos. Demostrando la relevancia de la astrogliá en el proceso de remielinización. Estos resultados sugieren una ventana de acción limitada de la activación de la astrogliá, mientras que su activación temprana ejerce efectos beneficiosos, su activación a largo plazo no parece atenuar la progresión de la EM.

El rol de los astrocitos en la EM presenta cierta controversia. Por una parte, se entiende que los astrocitos promueven la respuesta inflamatoria y neurotóxica por parte en las lesiones de la EM, pero estos también son capaces de ejercer un papel neuroprotector y reparador. Uno de los factores producidos por los astrocitos y las neuronas en el SNC sano es el BDNF. En modelos de EAE, la delección del BDNF específico de astrocitos incrementa la severidad del trastorno, con una mayor pérdida axonal. Además, en el modelo CPZ, el incremento en la producción de BDNF astrogliar, inducido por la estimulación de los receptores metabotrópicos de glutamato mGluR, demuestra una implicación positiva en el proceso de remielinización (Fulmer et al., 2014; D.-H. Lee et al., 2012; Linker et al., 2010). Por otro lado, la astrogliá es susceptible a los neuroesteroides. En el modelo EAE, se ha observado que el tratamiento con un agonista del receptor de estrógenos α (ERα) ejerce una mejora en la sintomatología, una menor infiltración celular y pérdida axonal. Estos efectos se asocian al ERα presente en la astrogliá, debido a que la delección condicional de éste es capaz de revertir los efectos observados (Spence et al., 2013).

Las células B son otro de los factores a considerar en el desarrollo de la EM. Uno de los factores que contribuye a la supervivencia y la proliferación de estas células es el factor

activador de células B (BAFF) (W. N. Khan, 2009). El cual es sintetizado por astrocitos que colocalizan con células inflamatorias que expresan receptores de BAFF (Krumbholz et al., 2005) y presenta una sobreexpresión en lesiones de EM. Sugiriendo la implicación de la astrogliosis en el desarrollo de la enfermedad asociado a la acción de las células B.

Ciertos fármacos y tratamientos aceptados para la EM tienen efectos sobre la función astrogliosis. Un ejemplo es el Fumarato de Dimetilo (DMF), SNC que incrementa el factor nuclear eritroide 2 en astrocitos, el cual ejerce un efecto protector sobre la respuesta al estrés oxidativo (Brennan et al., 2017). También, el DMF es capaz de inhibir la secreción de citoquinas proinflamatorias en microglía y astrogliosis (Galloway et al., 2017).

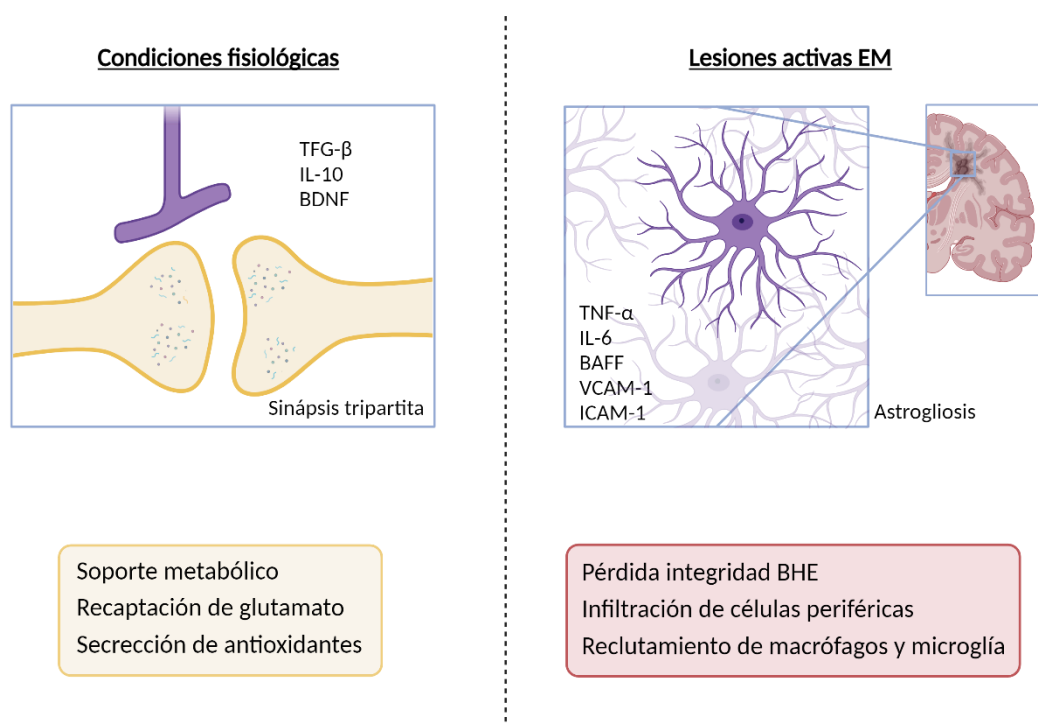


Figura 10. Esquema simplificado de la implicación y función de la astrogliosis en el cerebro sano y en las lesiones activas en esclerosis múltiple. [Abreviaturas en figura: Esclerosis múltiple (EM), Factor de crecimiento transformante β (TGF- β), Factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), Factor necrótico tumoral α (TNF- α), Factor activador de células B (BAFF), Molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1), Molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), Barrera hematoencefálica (BHE), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 10 (IL-10)]

1.4.3. Implicaciones de los receptores de adenosina en la Esclerosis Múltiple

Entre otras múltiples funciones, el sistema adenosinérgico destaca por su acción reguladora sobre el sistema inmune y el proceso inflamatorio. Por este motivo, se consideran a los receptores de adenosina como posibles dianas para el tratamiento de la EM.

Los principales receptores de adenosina expresados en el SNC son el A₁R y el A_{2A}R. Por un lado, el A₁R se expresa en múltiples tipos celulares cerebrales, y su activación se asocia con efectos neuroprotectores en condiciones fisiopatológicas. De hecho, el A₁R se expresa y es crucial para la activación de la microglía (Luongo et al., 2014). Así mismo, la acción de la adenosina mediante el A₁R reduce la proliferación de astrocitos e induce la producción del factor de crecimiento nervioso (Asong et al., 2019). En pacientes con EM se han observado niveles reducidos de la proteína y el RNA de A₁R, tanto en monocitos periféricos como en macrófagos y microglía residente del SNC (Johnston et al., 2001). La activación del A₁R en

pacientes de EM es capaz de inhibir la secreción de IL-6, citoquina proinflamatoria, en células sanguíneas periféricas mononucleares (Mayne et al., 1999). También se ha descrito, que la acción de la adenosina sobre el A₁R promueve la maduración y la migración de las células progenitoras de oligodendrocitos, favoreciendo el proceso de mielinización (Cherchi et al., 2021). Por lo que la disminución de A₁R en pacientes de EM, favorece la progresión del proceso neurodegenerativo. Además, se postula la sobreexpresión de β -arrestinas observada en etapas iniciales de la EM como el mecanismo responsable de la reducción de la expresión de A₁R (Tsutsui et al., 2008b). Así, un tratamiento temprano con agonistas del A₁R podría inhibir la excesiva respuesta inflamatoria, previniendo o retrasando el desarrollo de la neurodegeneración propia de etapas posteriores de la EM. Pero, por otro lado, se ha descrito que la activación inespecífica y específica de los AR (especialmente agonistas de A₁R y A_{2A}R administrados conjuntamente) es capaz de incrementar la permeabilidad de la BHE, y por tanto de promover la infiltración celular al parénquima cerebral. (Carman et al., 2011). Por lo que se sugiere una dualidad en la acción beneficiosa de la activación de A₁R, la cual se asocia a la etapa de la progresión de la EM.

Por otro lado, el A_{2A}R, en condiciones fisiológicas, se expresa principalmente en neuronas del estriado. En presencia de una lesión en el SNC, se ha descrito un aumento en la expresión de A_{2A}R. La función de A_{2A}R en neuronas se relaciona con la viabilidad celular, y se ha descrito como el uso de antagonistas de A_{2A}R ejerce un efecto neuroprotector, limitando el daño axonal (Canas et al., 2009). En células de microglía también se da una sobreexpresión de A_{2A}R, promoviendo la secreción de citoquinas proinflamatorias. Los antagonistas de A_{2A}R, en este caso, han demostrado un efecto inhibitorio sobre la activación de la microglía (C. Gomes et al., 2013; Minghetti et al., 2007). En pacientes de EM, el A_{2A}R se encuentra sobreexpresado en el endotelio próximo a la lesión en la materia blanca y en linfocitos (Y. Liu et al., 2018; Vincenzi et al., 2013).

De manera similar a los estudios enfocados en A₁R, la activación de A_{2A}R presenta resultados distantes en función del contexto tisular y el tiempo de actuación. En animales modelos EAE, KO para el receptor A_{2A}R, se ha observado un aumento en la severidad del trastorno (T. Wang et al., 2014; Yao et al., 2012). Concretamente, se observa un mayor daño axonal, así como una desmielinización más extendida y una mayor actividad microglial y de los linfocitos T CD4+. Resultados consistentes con un efecto antiinflamatorio de la activación A_{2A}R, pero aparentemente contrarias a la acción neuroprotectora resultante del uso de antagonistas de A_{2A}R. Este fenómeno, pero, podría ser explicado por una ventana terapéutica limitada de la activación de A_{2A}R. Se ha demostrado que el bloqueo de A_{2A}R tras el inicio sintomático de la EM reduce la infiltración celular, la desmielinización y los niveles de ciertas citoquinas como el IFN- γ . Mientras que, si el bloqueo de A_{2A}R se da en la fase asintomática o temprana de la enfermedad no afecta a la severidad. De manera interesante, al analizar la acción de agonistas de A_{2A}R ante la aparición de los primeros síntomas motores de la enfermedad se observó una inhibición de la capacidad fagocitaria de macrófagos y microglía, así como su migración in vitro, y su activación in vivo (Loram et al., 2015).

1.4.4. Implicaciones de los receptores de cannabinoides en la Esclerosis Múltiple

Actualmente el Sativex®, compuesto por una mezcla de Δ^8 -THC y CBD, se utiliza como DMT para tratar la espasticidad en pacientes adultos con EM. Siendo el primer medicamento cannabinoide aceptado para el tratamiento de este trastorno y abriendo una puerta al estudio de potenciales aplicaciones terapéuticas. La capacidad moduladora del sistema endocannabinoide a nivel de SNC, se atribuye principalmente al receptor CB₁, dada su

elevada expresión. Aunque cabe mencionar que no es el único receptor cannabinoide presente en el encéfalo.

En modelos experimentales de la enfermedad de EM, como es el modelo animal de encefalomiелitis autoinmune (EAE), que puede inducirse mediante la inmunización con péptidos derivados de la mielina, se plantea que la excitotoxicidad induce un mayor daño axonal asociado a una progresión acelerada de la sintomatología y la pérdida de funcionalidad (Pitt et al., 2000; Smith, Groom et al., 2000). Teniendo esto en cuenta, y el conocido rol del SEC en la prevención de la excitotoxicidad glutamatérgica inducida por el receptor de N-metil-D-aspartato (NMDAR), se ha evaluado el potencial de diversos compuestos cannabinoides (C. Gomes et al., 2013; Sánchez-Blázquez et al., 2013). Un ejemplo es el compuesto HU210. En el modelo de EM, TMEV-IDD, de sus iniciales en inglés *Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus-Induced Demyelinating Disease*, se observó que el HU210 ejerce un efecto neuroprotector. Este efecto, pero, necesita de la activación de ambos receptores canónicos de cannabinoides, CB₁R y CB₂R, en neuronas y astrocitos, respectivamente (Docagne et al., 2007). Mostrando, una vez más, la complejidad de la modulación ejercida por el SEC.

En células gliales se ha descrito que la unión de cannabinoides a CB₁R activa, entre otras, la vía de señalización PI3K/Akt/TOR, la desregulación de la cual se asocia a reacciones autoinmunes exacerbadas, conduciendo a una respuesta inmune por parte de los linfocitos T y la células B y promoviendo la desmielinización (Gómez Del Pulgar et al., 2002; Weber & Hemmer, 2010). En macrófagos y microglía del modelo animal EAE, también se ha descrito que la inhibición del CB₁R promueve la polarización de estos tipos celulares a un fenotipo M1-Th17, promoviendo la aparición temprana y la velocidad de la progresión del trastorno (Lou et al., 2018).

La activación de CB₁R ha demostrado, en el modelo TMEV-IDD, la capacidad de recuperar la autotolerancia a largo plazo y así, la capacidad del sistema inmune para reconocer la mielina como propia (Arevalo-Martin et al., 2012). En consecuencia, se ve modulada negativamente la respuesta mediada por linfocitos Treg específicos del SNC. De hecho, en el modelo EAE se ha observado como el tratamiento con Δ^9 -THC reduce significativamente la severidad de la enfermedad. Efecto revertido ante la delección específica del CB₁R neuronal (Maresz et al., 2007).

En otras enfermedades que cursan con inflamación también se ha demostrado la acción beneficiosa de la activación del CB₁R. Por ejemplo, se ha descrito como la araquidonil-2'-cloroetilamida (ACEA), agonista altamente selectivo de CB₁R, estimula la neurogénesis en el hipocampo de modelos animales de epilepsia, y es capaz de reducir el fenómeno discínético en modelos de EP. A la vez, su acción promueve la proliferación y maduración de las células precursoras de oligodendrocitos (Ilyasov et al., 2018; Leija-Salazar et al., 2020; Zagaja et al., 2019).

1.5. La enfermedad de Alzheimer

La demencia es un síndrome que puede ser causado por diferentes enfermedades, caracterizadas por la destrucción del parénquima cerebral y a la muerte neuronal, con el subsecuente deterioro cognitivo progresivo. La forma más común de demencia es la enfermedad de Alzheimer (EA), la cual presenta una neurodegeneración progresiva que afecta en fases iniciales a las capacidades de memoria y habla; resultando, en fases avanzadas, en una pérdida de la habilidad de llevar a cabo las actividades cotidianas.

La EA se considera una enfermedad multifactorial, su etiología combina una serie de factores de riesgo genéticos y ambientales entre los cuales destaca la edad avanzada del individuo. Aunque el desarrollo de la EA no es específico del proceso de envejecimiento, la probabilidad de padecerla aumenta exponencialmente en individuos por encima de los 65 años. Se han planteado múltiples teorías sobre el origen y el desarrollo de la EA para intentar explicar su sintomatología y progresión. La hipótesis clásica se basa en la presencia característica de agregados de proteína β -amiloide ($A\beta$) formando las denominadas placas seniles. Estas estructuras se generan como resultado de un mal plegamiento de la proteína $A\beta$ que lleva a su acumulación en el espacio intercelular. La producción de $A\beta$ resulta de la proteólisis de la proteína precursora amiloide (APP), la cual se expresa en neuronas y glía a nivel del SNC, pero también en muchos otros tejidos periféricos como son la glándula tiroidea, el riñón o el músculo esquelético. La producción y eliminación de $A\beta$ son necesarias para el normal funcionamiento del cerebro sano. La agregación, y por tanto la formación de las placas seniles se asocia a la proporción existente en el tejido de las distintas formas del péptido $A\beta$, así como al microambiente en que se encuentran. La reducción en la proporción $A\beta$ -42/ $A\beta$ -40 ha mostrado disminuir la agregación en modelos animales transgénicos (Gu & Guo, 2013). La forma $A\beta$ -40 es mucho más abundante, aunque en las placas seniles la forma predominante es la $A\beta$ -42, la cual presenta mayor susceptibilidad a la agregación, y consecuentemente, es la forma más detectada en pacientes con EA (Stine et al., 2003). Entre otros, estudios genéticos que respaldan la teoría clásica, demuestran que los genes principalmente asociados con el desarrollo de la EA son: *APP*, *PSEN1*, *PSEN2* y *APOE* (Levin & Vasenina, 2016). Todos ellos relacionados con el procesamiento de APP.

Los efectos derivados de la acumulación de $A\beta$ en placas seniles no representan un daño suficiente a nivel de SNC como para el grave declive cognitivo observado en los pacientes de EA. Por lo que la comunidad científica investiga la posibilidad de ampliar la hipótesis clásica basándose en otras particularidades de la enfermedad. Los oligómeros solubles de la proteína $A\beta$ presentan un rol patogénico en la EA, que parece estar relacionado con la pérdida de sinapsis, y por tanto con la muerte neuronal (Terry et al., 1991). En el modelo animal transgénico de la EA, APP-V717 (PD-APP) se han descrito alteraciones en procesos de potenciación a largo plazo (LTP) previos a la formación de placas seniles (Larson et al., 1999). Así mismo, se ha descrito la capacidad de las estructuras no fibrilares de $A\beta$ para bloquear dichos procesos de LTP en cortes de cerebro e *in vivo* en el mismo modelo EP-APP (Lambert et al., 1998). De hecho, en el modelo transgénico de EA en el cual se induce amiloidosis cerebral mediante la expresión del gen *APP* humano con la mutación *Swedish* (*APP_{Sw}*), se ha descrito que la presencia de oligómeros solubles de $A\beta$ es suficiente y necesaria para inducir sinaptotoxicidad y la neurodegeneración, conduciendo a alteraciones del comportamiento (Walsh et al., 2002).

Fisiológicamente, la eliminación de $A\beta$ del SNC se produce mediante múltiples vías. A nivel de la progresión de la EA, la vía que se ha demostrado que presenta una mayor relevancia EA es la dependiente del sistema inmune, mediada por la respuesta de células residentes. El fenómeno de gliosis promueve la inflamación del tejido nervioso, agravando el progreso de la EA. La microglía se activa ante la presencia de agregados de $A\beta$ para inducir su eliminación, lo cual conlleva una secreción de gran cantidad de citoquinas proinflamatorias y especies reactivas de oxígeno (Rubio-Perez & Morillas-Ruiz, 2012). Así mismo, se ha descrito que la actividad microglial es capaz de promover el fenotipo proinflamatorio de astrocitos, exacerbando aún más la respuesta inmune, y, por tanto, agravando el progreso de la EA (Liddel et al., 2017). La microglía activada de manera crónica, sin embargo, presenta una disminución de su actividad fagocítica. Lo que conlleva a una menor capacidad para eliminar las placas seniles; mientras la secreción de citoquinas continua promueve la

pérdida de sinapsis y la apoptosis neuronal (Figura 11)(Heneka et al., 2015; Krabbe et al., 2013). Diversos estudios genéticos y transcriptómicos respaldan la relevancia de diferentes vías de señalización relacionadas con la microglía como marcadores de riesgo en la EA (Bolós et al., 2017; B. Zhang et al., 2013).

Otro aspecto característico de la EA es la presencia de ovillos neurofibrilares (ONF) intracelulares constituidos por la agregación de la proteína asociada a microtúbulos τ (tau) en su forma hiperfosforilada (Brier et al., 2016). La proteína tau, presenta un dominio de unión a microtúbulos, y, en condiciones fisiológicas participa en la correcta maduración de los microtúbulos estables. En la EA la proteína tau experimenta una anormal fosforilación, que conlleva un incorrecto plegamiento, dando lugar a formas insolubles que tienden a agregarse. De hecho, se ha descrito como la proteína tau hiperfosforilada es capaz de secuestrar y promover la agregación de proteína tau no hiperfosforilada (Alonso et al., 2018). Los motivos por los que se da la fosforilación anómala de la proteína tau no han sido descritos, pero estudios que demuestran que la hiperfosforilación de la proteína tau está relacionada con la presencia y la actividad de $A\beta$ en el espacio extracelular (Franzmeier et al., 2020; W. J. Lee et al., 2022; O'Brien & Wong, 2011). La presencia de estos ONF altera el transporte interno celular, disrumpiendo el metabolismo celular y causando la muerte neuronal (Eftekharzadeh et al., 2018)(Figura 11). Abriendo una nueva ventana en la investigación del desarrollo de la EA, dado que el proceso neurodegenerativo inducido por la acumulación de ONF, conduce al deterioro cognitivo observado en pacientes de EA.

Por otro lado, el sistema inmune juega un rol relevante en el proceso patológico asociado a la hiperfosforilación y agregación de tau. La activación del complemento, en el SNC sano es crucial para la actividad de poda sináptica, llevada a cabo por la microglía. Este proceso se basa en la eliminación de sinapsis sobrantes, para el correcto funcionamiento cerebral. En etapas tempranas de la EA, se ha observado un aumento en la actividad de poda sináptica, sugiriendo cierta perturbación en el proceso de plasticidad sináptica (Hong et al., 2016). De hecho, la activación de la vía del complemento en microglía circundante a los terminales sinápticos ha demostrado exacerbar la patología asociada a tau (Britschgi et al., 2012). Así mismo, se ha descrito que la microglía colabora en la propagación intercelular de proteína tau, mediante la secreción de exosomas, promoviendo la extensión y la severidad de la EA asociada a tau (Asai et al., 2015).

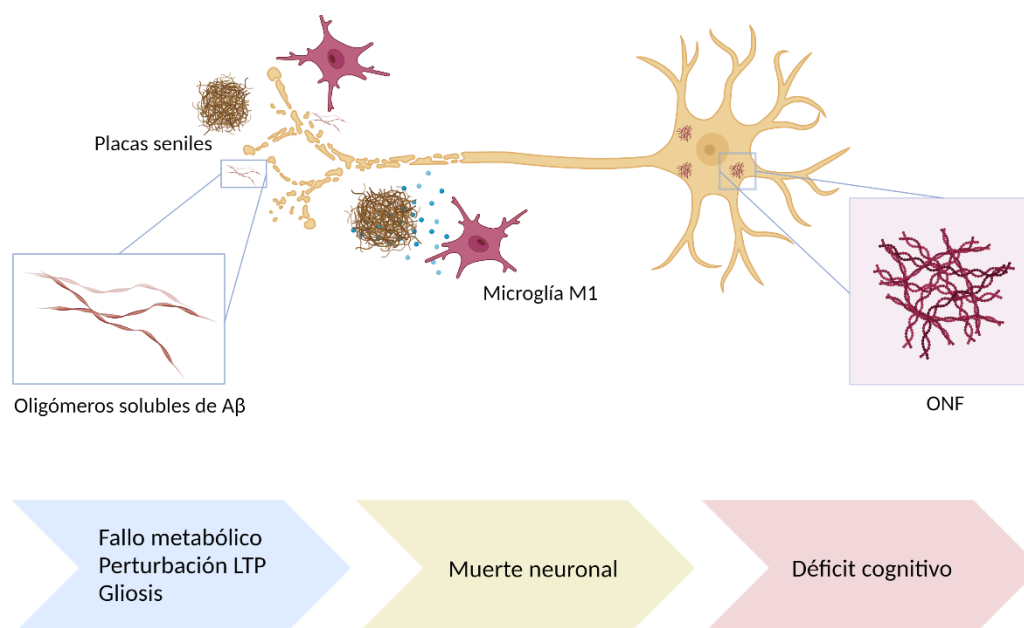


Figura 11. Esquema de la progresión de la enfermedad de Alzheimer y factores descritos como elementos claves para su desarrollo. [Abreviaturas en figura: Péptido β -amiloide ($A\beta$), Ovillos neurofibrilares (ONF)]

Estudios recientes describen que la microbiota intestinal puede influenciar en el desarrollo de diversas enfermedades neurodegenerativas. La microbiota está constituida por una enorme variedad de microorganismos (Belkaid & Harrison, 2017) y actúa como una de las primeras barreras frente a la exposición a patógenos o sustancias nocivas introducidas al organismo mediante el tracto gastrointestinal. Del mismo modo que es una fuente de gran cantidad de metabolitos y precursores que intervienen en funciones del SNC (Cattaneo et al., 2017; Park et al., 2017). La relación entre la microbiota y la cognición se introduce junto con la descripción del eje intestinal-cerebral (Gareau, 2014). Los microorganismos presentes en la mucosa intestinal son capaces de activar al sistema inmune, promoviendo la secreción de citoquinas proinflamatorias, que, mediante el sistema circulatorio, así como el linfático, son capaces de atravesar la BHE, exacerbando procesos de neuroinflamación. De hecho, se ha descrito como la activación proinflamatoria aberrante por parte del microbioma favorece la agregación de $A\beta$ y tau, promoviendo la amiloidosis y alterando la correcta maduración de la microglía, en modelos de EA (Erny et al., 2015; Honarpisheh et al., 2020; Saksida et al., 2018; Xu & Wang, 2016).

1.5.1. Epidemiología y diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer

En 2020 la suma de individuos que padecían demencia ascendía a 55 millones de personas a nivel mundial. Además, debido al creciente envejecimiento poblacional, se calcula que en cuestión de 20 años este número se verá duplicado, llegando a finales del 2030 con alrededor de 78 millones de diagnósticos. Entre el 60-80% de los casos de demencia se asocian al desarrollo de la EA, aunque muchos pacientes de demencia presentan un patrón mixto, con un cuadro clínico que incluye varios trastornos neurodegenerativos (Alzheimer's association, 2023). En Europa la prevalencia de la EA se calculaba alrededor de un 5,05%, con una incidencia de 7,02 por cada 1.000 personas/año y 13,25 por cada 1.000 personas/año, en hombre y mujeres, respectivamente (Niu et al., 2017; Tahami Monfared et al., 2022). En España, en 2019, la prevalencia de EA entre los individuos de 75-79 años

ascendía al 6,9%, llegando a casi triplicarse en el rango de los 85-89 años, con un 20,1% (Ministerio de Sanidad, 2019).

El riesgo de padecer EA aumenta exponencialmente con la edad, especialmente a partir de los 65 años. El daño neuronal causado por la EA, aparte de resultar en una evolución progresiva del déficit cognitivo conlleva la muerte del individuo. En pacientes por encima de los 65 años se calcula que la media de supervivencia es entre 4-8 años tras su diagnóstico.

Los primeros signos cognitivos en individuos con EA se presentan en términos de memoria reciente, con una cierta facilidad para olvidar nueva información. Aumentando, eventualmente, la dificultad a la hora de llevar a cabo tareas diarias o de resolución de problemas. Seguidos, eventualmente, por fenómenos de confusión espacial y temporal. El diagnóstico temprano de la EA conlleva, así, una serie de beneficios en la calidad de vida de los pacientes, dado que gran parte de los medicamentos aprobados se enfocan en el tratamiento sintomatológico o la paliación de la progresión del trastorno en las etapas más tempranas. En las etapas tardías, el tratamiento se dificulta por el daño cognitivo acumulado (Alzheimer's association, 2023).

Para el diagnóstico de la EA, se llevan a cabo una serie de pruebas para la evaluación de las habilidades asociadas a la pérdida de memoria, a la resolución de problemas o simplemente a la atención. Estas pruebas se complementan, en ocasiones, con evaluaciones psiquiátricas para la determinación de afectaciones comportamentales, y la exclusión de otros trastornos. Una vez realizadas las primeras evaluaciones, el diagnóstico definitivo depende de los exámenes y análisis en busca de marcadores propios de la EA. Es común el uso de técnicas de imagen, como la tomografía computarizada (TC), el MRI o la tomografía de emisión positrónica (PET). Esta última, en el caso de la EA permite la detección de placas seniles y cúmulos anormales de tau. También destaca en la práctica clínica, la detección de biomarcadores en muestras sanguíneas o de CSF. Siendo la más habitual la detección de la forma A β -42 en CSF, prueba con mayor precisión frente a su detección en plasma (James, P. Klaas, 2022).

1.5.1.1. Investigación actual

Teniendo en cuenta que algunos de los fenómenos característicos del desarrollo de la EA pueden iniciarse décadas antes de su diagnóstico y la diversa sintomatología presentada por los pacientes en fase preclínica, la identificación de nuevos biomarcadores y factores genéticos de riesgo cobra gran relevancia. También resulta imprescindible la investigación para el desarrollo de nuevas moléculas o compuestos capaces de paliar o bloquear el progreso de la EA.

Se han descrito múltiples proteínas y moléculas como potenciales biomarcadores para el diagnóstico de la EA. Abarcando las diferentes características de la enfermedad, entre ellas la acumulación anormal de A β y tau hiperfosforilada, la neuroinflamación o la neurodegeneración. Buscando, no tan solo, encontrar marcadores precisos, sino también incrementando el número de marcadores disponibles para una evaluación combinatoria, que resulta en una mayor eficiencia a nivel clínico. Entre los biomarcadores propuestos en los últimos años se encuentra la neurogranina, una proteína de unión a calmodulina. Se ha descrito la elevada expresión de neurogranina en áreas del cerebro afectadas por la EA, especialmente en el hipocampo. Actuando como un marcador de degeneración o pérdida sináptica (Guadaño-Ferraz, Viñuela, Oeding, Bernal, & Rausell, 2005; Kester et al., 2015; Kvartsberg et al., 2015; Wellington et al., 2016).

Otro recurso que presenta gran potencial es el uso de microARN (miRNA), los cuales han mostrado, mediante revisión sistemática, grandes resultados en el diagnóstico prematuro, incluso 20 años antes del desarrollo clínico de la EA (Swarbrick, Wragg, Ghosh, & Stolzing, 2019). En situaciones patológicas, los niveles de varios miRNA se encuentran alterados. En el caso de pacientes de EA se ha descrito la disminución del miR-125b y del miR-126b en LCR. Estos miRNA, entre otros, regulan factores inflamatorios pudiendo afectar al desarrollo de la EA (Galimberti et al., 2014; Jin et al., 2018). Especialmente el estudio de exosomas ha tomado gran relevancia en el estudio de estos marcadores miRNA. Dado que los exosomas encapsulan una elevada concentración de miRNA en su interior. Así mismo al ser resultado de empaquetamiento no-aleatorio y poder atravesar la BHE, muestran gran correlación con el estadio patológico y pueden ser detectados mediante análisis poco invasivos (Dehghani et al., 2018; Forero et al., 2019).

Farmacológicamente, el uso de anticuerpos monoclonales, la mayoría de los cuales actúan sobre la agregación de A β , muestra gran potencial a nivel de los ensayos clínicos. Un ejemplo es el medicamento Aduhelm™, con principio activo aducanumab, que reconoce las formas fibrilares solubles e insolubles de A β . En un inicio se planteaba como tratamiento en estadios de deterioro cognitivo leve, pero su propuesta de comercialización en Europa fue retirada tras la negativa por parte de la EMA al evaluar los efectos secundarios y los riesgos asociados (Newton, 2022). Otro ejemplo es el gantenerumab, un anticuerpo monoclonal contra la forma fibrilar A β , que aunque no cumple los resultados clínicos esperado al finalizar los ensayos en fase III, demostró una mejora del 8% frente al tratamiento placebo (Bateman et al., 2022). Por otro lado, el lecanemab, un anticuerpo que reconoce las protofibrillas de A β , se comercializó en los Estados Unidos bajo la marca comercial LEQEMBI™, como tratamiento para pacientes con demencia leve o asociada a una discapacidad cognitiva leve (van Dyck et al., 2022) y tras una exitosa fase III fue aprobado a principios del 2023 tanto por la FDA como por la EMA. Otro medicamento en la misma línea es el donanemab, pendiente de ser aprobado este año por la FDA y la EMA para su comercialización en Europa, convirtiéndose, en menos de dos años, en el tercer medicamento aprobado dirigido al tratamiento de la EA.

1.5.2. Implicaciones de los receptores de adenosina en la enfermedad de Alzheimer

El rol modulador del sistema adenosinérgico, adquiere una gran relevancia en el estudio de las enfermedades neuropsiquiátricas como la EA, que cursan con un proceso inflamatorio.

El receptor de adenosina A_{2A}R, como se ha introducido previamente, presenta un papel modulador a nivel del sistema inmune y favorece los procesos de neuroinflamación. En individuos de edad avanzada se ha descrito el aumento de la expresión de A_{2A}R a nivel cerebral (Temido-Ferreira et al., 2020), especialmente en terminales glutamatérgicos (Canas, Duarte, Rodrigues, Köfalvi, & Cunha, 2009). La activación del receptor A_{2A}R, de hecho, es capaz de promover déficits de memoria en ciertos animales. En estudios optogenéticos, la pérdida de memoria espacial se asocia concretamente al área del hipocampo. Estos efectos causados por el A_{2A}R en el hipocampo se asocian, principalmente, a la regulación de la liberación de glutamato en el espacio sináptico (P. Li et al., 2015; Pereira et al., 2005). Además, se ha descrito que la actividad del A_{2A}R a nivel presináptico, en combinación con la acción de los receptores de NMDA, genera un flujo anormal de calcio catiónico al interior celular, alterando la neurotransmisión y la homeostasis celular (Temido-Ferreira et al., 2020). El bloqueo del A_{2A}R, de hecho, ha demostrado inhibir el

proceso de sinaptotoxicidad, y por tanto revertir los efectos promovidos por la acumulación del péptido A β en modelos animales de EA con carácter agudo y crónico (Faivre et al., 2018; Silva et al., 2018).

Cambios en los niveles de expresión de A_{2A}R también han sido descritos en modelos y pacientes de la EA (Carvalho et al., 2019). En muestras de córtex frontal de pacientes de EA se ha descrito una sobreexpresión del receptor A_{2A}R, en comparación con controles de la misma edad (Albasanz et al., 2008). Fenómeno que también se observa en pacientes con degeneración lobar frontotemporal, más concretamente en neuronas que presentan NFT (Carvalho et al., 2019). Relacionando así el receptor A_{2A}R con la patología asociada a la anormal agregación de proteína tau hiperfosforilada. Por lo que se sugiere una correlación directa entre los niveles de ARN mensajero (mRNA) de A_{2A}R con el desarrollo de la EA (Orr et al., 2015). Algunos estudios asocian la sobreexpresión de A_{2A}R a la función microglial, ya que en hipocampo y córtex de pacientes de EA, se ha observado el aumento de la expresión de A_{2A}R en estas células inmunitarias (Angulo et al., 2003).

El receptor de adenosina A₃R, aunque presenta un nivel de expresión limitado, se extiende a gran parte del CNS, principalmente, en el hipocampo y el cerebelo, donde la activación del A₃R se asocia a efectos neuroprotectores. Un ejemplo de ello se describe en modelos de lesión traumática cerebral (Bozdemir et al., 2021), donde el A₃R modula negativamente la respuesta inmunológica en procesos crónicos. El receptor A₃R, de hecho, presenta efectos inhibitorios sobre la gliosis reactiva, proceso inflamatorio común en las lesiones del CNS y en la EA, que marca la severidad y la velocidad del declive cognitivo y la consecuente pérdida de memoria (De Sousa, 2022; Ferreira-Silva et al., 2020). También se ha descrito que la cafeína ejerce un efecto protector a través del receptor A₃R, suprimiendo la internalización de APP (S. Li et al., 2015), con un efecto directo en el procesamiento y obtención del péptido A β . Planteando así una mayor complejidad subyacente a la actividad de los receptores de adenosina en el proceso fisiopatológico de la EA.

1.5.3. Receptor de N-metil-D-aspartato (NMDAR)

El glutamato es el aminoácido libre más abundante en el CNS, siendo a su vez, el neurotransmisor excitatorio principal en el cerebro humano. A parte de esta función excitatoria, el glutamato forma parte de abundantes vías metabólicas, e interviene en procesos de plasticidad neuronal, estando involucrado en la memoria y el aprendizaje (Riedel et al., 2003). Generando así un gran interés en la investigación de trastornos neurodegenerativos como la EA.

La señalización en el CNS asociada al glutamato depende principalmente de su unión a los diversos tipos de receptores de glutamato (GluR) presentes en la membrana de neuronas y glía (Koehl et al., 2019).

Los receptores de glutamato se dividen en dos grandes grupos: los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR), que se catalogan dentro de la superfamilia de GPCR de clase C ; y, los receptores ionotrópicos de glutamato, que son canales iónicos (iGluR). Los receptores ionotrópicos son los principales encargados de la función excitatoria cerebral en mamíferos. Dentro de este grupo, destaca el receptor de N-metil-D-aspartato (NMDAR).

El NMDAR es un receptor tetramérico constituido por un total de cuatro subunidades. Estas subunidades se identifican en tres subtipos (Moriyoshi et al., 1991): las subunidades GluN1, con dos subtipos descritos (A y B) y con un carácter regulador otorgado por sus dominios de unión a glicina (o serina). Las subunidades GluN3, que también tienen dos tipos descritos,

A y B. Y las subunidades GluN2, de las cuales se han descrito cuatro subtipos (A-D) y que otorgan variabilidad funcional al receptor, determinando su localización tisular. Estas subunidades presentan los centros de unión a glutamato, determinando la selectividad del receptor.

El receptor NMDA es un tetrámero constituido por una combinación de cuatro subunidades (GluN). En humanos, dos de estas subunidades pertenecen al tipo GluN1, mayoritariamente siendo las restantes dos subunidades GluN2 (Figura 12). Aunque se han descrito tetrámeros menos comunes compuestos por combinaciones de GluN2 y GluN3, o incluso dos subunidades GluN3. Las subunidades del receptor NMDA forman un canal iónico que se encuentra constitutivamente bloqueado por iones de magnesio o zinc, los cuales previenen la entrada de cationes al interior celular.

La activación del receptor NMDA es dependiente de voltaje y de ligando (Flores-Soto et al., 2012). Por tanto, por un lado, es necesaria la despolarización de la membrana celular para el desplazamiento del bloqueo iónico. Y, por otro lado, será necesaria la unión tanto del glutamato, como del denominado co-agonista, la glicina o la serina. Resultando este proceso en la entrada no selectiva de cationes al interior celular a través del canal NMDAR, desencadenando múltiples funciones asociadas a respuestas a largo plazo en las sinapsis excitatorias (Figura 12).

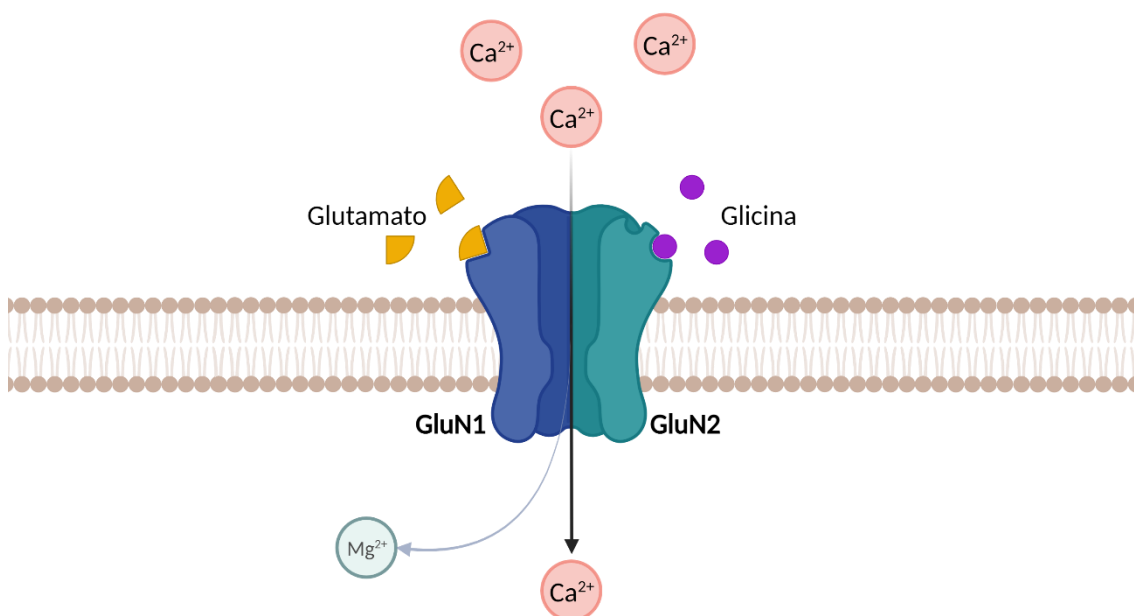


Figura 12. Receptor de N-metil-D-aspartato (NMDAR) en su estado conformacional activado. [Cation calcio (Ca^{2+}), Cation magnesio (Mg^{2+})]

El NMDAR se expresa mayoritariamente en el CNS pero también se extiende a multitud de tejidos y células periféricas, como son los islotes pancreáticos, la medula adrenal, el corazón o algunas células óseas (Hinoi et al., 2004; Leung et al., 2002). La función del NMDAR en riñón se asocia principalmente al fenómeno de vasodilatación mediado por glicina. Consecuentemente, el uso de antagonistas de NMDAR induce la vasoconstricción promovida por el tratamiento con glicina. Así, animales alimentados con dieta baja en proteínas muestran una importante limitación en los niveles de glicina y una disminución en la función de NMDAR (Deng et al., 2002; Slomowitz et al., 2004). A nivel de la médula ósea, se ha observado que el bloqueo del NMDAR es capaz de inducir una reducción en la

mineralización de la matriz. También se ha descrito que el tratamiento con NMDA promueve la diferenciación de las células precursoras de osteoblastos. Este efecto se ve revertido con los antagonistas específicos de NMDAR (Ho et al., 2005; Lin et al., 2008).

En el CNS, especialmente en contextos fisiopatológicos, se divide la expresión del receptor NMDA en dos subpoblaciones: el NMDAR sináptico, principalmente presente en los terminales postsinápticos, y el NMDAR extrasináptico, que se distribuye por la membrana celular con especial presencia en espinas postsinápticas. El NMDAR sináptico es crucial para la supervivencia neuronal, mientras que se ha descrito que la activación del NMDAR extrasináptico promueve la pérdida neuronal (Hardingham & Bading, 2010; Parsons & Raymond, 2014). Clásicamente, en casos de EA se ha descrito una disminución de los niveles cerebrales de NMDAR (Hynd et al., 2001). Así mismo, en pacientes con EA, se ha observado una disminución de los niveles de subunidades NR1 en hipocampo (Mishizen-Eberz et al., 2004). Consistente con la internalización activa de los NMDAR sinápticos descrita ante el tratamiento con la isoforma A β -42 en neuronas corticales. Efecto también observado en modelos de APP_{Sw} que cursan con la sobreexpresión de A β -42 (Snyder et al., 2005). La regionalización de los NMDAR parece explicar, teniendo en cuenta la relación entre los receptores sinápticos y los receptores extrasinápticos, la disminución en la expresión general observada. Puesto que, por otro lado, el incremento en la activación de los NMDAR extrasinápticos, se asocia con el fenómeno de excitotoxicidad, y por tanto con la muerte celular y el progreso de la EA. De hecho, uno de los fármacos aprobados para el tratamiento de la EA es la memantina, antagonista no competitivo del receptor NMDA. La cual, se ha descrito actúa a nivel de los NMDAR extrasinápticos (Xia et al., 2010). La memantina es capaz de revertir la deficiencia observada en LTP producida por la acumulación de formas solubles de A β -42, evitando la exacerbación de los síntomas cognitivos derivados de la excitotoxicidad dependiente de la activación anormal de NMDAR (Klyubin et al., 2011; Rammes et al., 2011). Se ha demostrado como los NMDAR extrasinápticos son capaces de interaccionar con formas solubles del péptido A β (Snyder et al., 2005). Por lo que los receptores NMDA extrasinápticos toman gran relevancia como diana terapéutica en el estudio de la EA, y otras enfermedades neuropsiquiátricas que cursan con muerte neuronal.

Las implicaciones de NMDAR en el CNS, así como en la fisiopatología de la EA adquieren una mayor complejidad con la descripción de diversos complejos heteroméricos constituidos por el NMDAR y otros receptores. El heterómero formado por NMDAR y el receptor de adenosina A_{2A}R es un claro ejemplo. Teniendo en cuenta el incremento en la liberación de glutamato ante la activación de A_{2A}R, la cual promueve el fenómeno de excitotoxicidad. Se ha demostrado la expresión del heterómero A_{2A}R-NMDAR en neuronas y especialmente en microglía activada (Rafael Franco et al., 2020). En estas células se ha observado un fenómeno de crossantagonismo por parte de los antagonistas específicos de ambos receptores. Sugiriendo una posible nueva indicación para los antagonistas del receptor A_{2A}R, actuando sobre el heterómero A_{2A}R-NMDAR y bloqueando la excitotoxicidad asociada a la actividad de NMDAR.

Existen otros heterómeros constituidos por el NMDAR que han sido descritos con relevancia en el desarrollo de la EA. Un claro ejemplo es el heterotrímero junto al receptor de dopamina D₁R y el receptor de histamina 3 (H₃R) D₁R-H₃R-NMDAR (Rodríguez-Ruiz et al., 2017). En este complejo se observa un fenómeno de crossantagonismo por parte de los antagonistas específicos de H₃R capaz de inhibir la muerte celular dependiente de la actividad excitotóxica de D₁R y NMDAR en cultivos organotípicos de corteza. Por otro lado, en cultivos primarios de neuronas y microglía del modelo transgénico de EA, APP_{Sw/Ind}, se ha descrito la sobreexpresión del heterómero CB₂R-NMDAR. En este caso, se observa un *crosstalk*

negativo, donde la estimulación con ambos agonistas específicos resulta en una señal inferior a la obtenida de la activación independiente de los receptores (Rivas-Santisteban et al., 2021). La activación del receptor cannabinoide ejerce un efecto inhibitorio sobre la acción de NMDAR. Sugiriendo una nueva vía en la que los cannabinoides ejercen un efecto neuroprotector, paliando el progreso del deterioro cognitivo propio de la EA.

Teniendo en cuenta el relevante papel del glutamato a nivel del CNS, y la acción de los receptores NMDA, específicamente los extrasinápticos, que promueven fenómenos de neurotoxicidad. El estudio de la regulación de la actividad de NMDAR, formando o no complejos con otros receptores, presenta gran potencial como diana terapéutica en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como es la EA.

A microscopic image of neurons, showing their cell bodies (soma) and branching processes (dendrites and axons) against a solid blue background. The neurons are dark, almost black, and their branching patterns are complex and interconnected. One large neuron is prominent in the upper center, while another is visible in the lower right. The overall image has a scientific, clinical feel.

OBJETIVOS

2.OBJETIVOS

Objetivo 1. Determinar la formación y funcionalidad de los heterómeros entre los receptores de adenosina A_1 y de cannabinoides CB_1 estudiando en células HEK-293T transfectadas y en cultivos primarios de neuronas corticales y de astrogliá. Detectar los cambios de expresión del complejo A_1R - CB_1R en tejido cerebral de un modelo animal de Esclerosis múltiple.

Objetivo 2. Estudio de la estequiometría de los receptores A_1 y A_{2A} y la expresión del heterómero A_1R - $A_{2A}R$ en una línea celular estable de glioblastoma. Análisis de la funcionalidad del complejo A_1R - $A_{2A}R$ en cultivos primarios de astrogliá. Detección de los niveles de expresión del complejo A_1R - $A_{2A}R$ en tejido cerebral de un modelo animal de Esclerosis múltiple.

Objetivo 3. Determinar la expresión y la funcionalidad del heterómero $A_{2A}R$ - A_3R en cultivos primarios de neuronas corticales, hipocámpales y estriatales.

Objetivo 4. Determinar la formación de heterómeros entre el receptor de cannabinoides CB_1 y el receptor ionotrópico de glutamato NMDA en células HEK-293T. Estudiar la funcionalidad del complejo CB_1R -NMDAR en cultivos primarios de neuronas corticales tratados con $A\beta$ o vehículo.

A microscopic image of neurons, showing their cell bodies (soma) and branching processes (dendrites and axons) against a solid blue background. The neurons are dark, almost black, and their branching patterns are complex and interconnected.

METODOLOGÍA

3. METODOLOGÍA

3.1. Reactivos y líneas celulares

Para el desarrollo de las diferentes técnicas realizadas se utilizaron los siguientes ligandos: el agonista selectivo de CB₁R, ACEA (ref. 1319), dos agonistas y un antagonista selectivos de A₁R N⁶-Ciclopentiladenosina (CPA) (ref. 1702), (-)-N⁶-(2-Fenilisopropil)-adenosina (R-PIA) (ref. P4532) y DPCPX (ref. 439) respectivamente, el agonista y antagonista selectivos de A₃R, el 2-Cl-IBMECA (ref. 1104) y el clorhidrato de PSB-10 (ref. 2010, referido como PSB-10) respectivamente, la sal amónica de PSB0777 (ref. 4334, referido como PSB777) como agonista selectivo de A_{2A}R, el Cannabidiol (CBD) (ref. 1570), el agonista y el antagonista selectivos de NMDAR, NMDA (ref. 0114) y MK-801 (ref. 0955), respectivamente. Todos ellos fueron adquiridos en Tocris (Bristol, RU). También se utilizaron los reactivos siguientes: el lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* O111:B4 (ref. L4391), el péptido Aβ1-42 (ref. PP69) y la Cuprizona (CPZ) (ref. 14690) que fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (MO, EE.UU.). El clorhidrato de Rimonabant, antagonista selectivo de CB₁R, referido a partir de ahora simplemente como Rimonabant o SR141617 (ref. HY-14137), el SCH58261, antagonista de A_{2A}R (ref. HY-19533), así como su agonista selectivo el clorhidrato de CGS21680, referido como CGS21680 (ref. HY-15371) se obtuvieron en MedChemExpress (NJ, EE.UU.).

Las líneas estables utilizadas fueron obtenidas del *American type culture collection* (ATCC) (VA, EE.UU.). Siendo estas: las células embrionarias de riñón humano HEK-293T/17 (CRL-11268), referidas como HEK-293T. Las células ováricas de hámster chino CHO-K₁ (CCL-61) referidas simplemente como CHO y la línea estable obtenida de glioblastoma de rata: C6 (CCL-107).

3.1.1. Producción de oligómeros Aβ

Los oligómeros Aβ humanos (Sigma-Aldrich, MO, EE.UU.) se prepararon siguiendo el protocolo previamente establecido (Klein, 2002). Brevemente, el Aβ1-42 liofilizado fue disgregado en 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) (ref. B2517, Sigma-Aldrich, MO, EE.UU.) a una concentración de 0,5 mg/ml. Después, el HFIP se vaporó a temperatura ambiente (RT) y el producto se almacenó a -80 °C. 24 horas previas al experimento el péptido se disolvió en DMSO y a continuación se sonicó en intervalos de 30 segundos un total de 240 segundos con una potencia del 35% usando el sonicador *cup horn* (Sonifier® SFX, Barcelona, España). Finalmente, el péptido fue diluido a 50 μM en medio F12 (Thermo Fisher Scientific, Paisley, RU) y almacenado a 4 °C durante 24 horas para la oligomerización. Para

cada experimento se utilizó una preparación fresca de oligómeros.

3.2. Cultivo celular y expresión heteróloga

Las células HEK-293T, así como las CHO se cultivaron para su crecimiento en medio DMEM, del inglés *Dulbecco's modified Eagle's medium* (Thermo Fisher Scientific, Paisley, RU) suplementado con suero bovino fetal inactivado por calor (FBS) al 5% (v/v), L-glutamina a 2 mM, 100 U/ml de antibiótico combinado (penicilina y estreptomicina) y una solución de aminoácidos MEM non-essential (1/100). Todos los suplementos anteriores fueron adquiridos en Thermo Fisher Scientific (Paisley, RU). Las células C6 se cultivaron para su crecimiento en medio DMEM con la mezcla de nutrientes F12-Ham (ref. D6421, Sigma-Aldrich, MO, EE.UU.) y FBS al 10% (v/v) y 100 U/ml de antibiótico combinado (penicilina y

estreptomycin) (Thermo Fisher Scientific, Paisley, RU). Las células se mantuvieron a 37 °C, con un 5% de CO₂ en una atmósfera húmeda.

Cuando se indica, las células HEK-293T o CHO fueron transfectadas de manera transitoria con los ADNc correspondientes mediante el método de la Polietilenimina (PEI) (Sigma-Aldrich, MO, EE.UU.). Brevemente, el ADNc se diluyó en cloruro de sodio (NaCl) (150 nM) y se mezcló con una solución de PEI (40 µM) en NaCl (150 nM) durante 10 minutos. Seguidamente, las células se incubaron con la mezcla adecuada en medio no suplementado. Tras 4 horas, el medio se reemplazó por medio fresco DMEM suplementado y las células se mantuvieron a 37 °C con un 5% de CO₂ en una atmósfera húmeda durante 48 horas.

3.2.1. Proteínas de fusión y vectores de expresión

Los ADNc de las proteínas humanas correspondientes a A₁R, CB₁R, A_{2A}R, D₁R, 5-HT_{2B}R, β-Arrestina II y a la subunidad NR1 del receptor NMDA, clonados en el vector pDNAc3.1 (Invitrogen™, Life Technologies, MA, EE.UU.) fueron amplificados sin sus correspondientes codones *stop* utilizando cebadores específicos sentido y antisentido con lugares de restricción: EcoRI y BAMHI en los casos de A₁R, D₁R y 5-HT_{2B}R, HindIII y BamHI en los casos de A_{2A}R y la subunidad NR1 del receptor NMDA, BamHI y KpnI para CB₁R y NheI y BamHI en el caso de β-Arrestina II. Para la obtención de los constructos A₁R-Rluc, D₁R-Rluc, 5-HT_{2B}R-Rluc, NR1-Rluc y β-Arrestina II-Rluc la clonación se llevó a cabo en el vector pRluc-N1 (PerkinElmer, MA, EE.UU.). Para la obtención de los constructos A₁R-YFP, CB₁R-YFP y A_{2A}R-YFP la clonación se llevó a cabo en el en el vector pEYFP-N1, variante amarilla aumentada de la GFP (Clontech, Heidelberg, Alemania). Los fragmentos fueron subclonados para encontrarse en fase y obtener los plásmidos que expresarían las proteínas de fusión especificadas en el extremo C terminal del receptor o proteína correspondiente.

3.2.2. Obtención de cultivos primarios de neuronas

Para la obtención de cultivos primarios de neuronas corticales, hipocampales y estriatales se utilizaron cerebros de fetos de ratón C57/BL6J (edad gestacional: 17 días). El aislamiento de las neuronas se inició con la extracción de los cerebros y el aislamiento de la región cortical, hipocampal o estriatal de ambos hemisferios. A continuación, se procedió a la disgregación química usando el enzima TrypLE™ express (1x) (Thermo Fisher Scientific (Paisley, RU) seguida de la disgregación mecánica utilizando jeringas de diferentes diámetros (21G y 25G). Tras el filtrado de la muestra por una malla de 100 µm, se centrifugaron las células (7 minutos, 200 g) y se resuspendió el pellet obtenido en medio DMEM completo (suplementado con suero bovino fetal inactivado por calor (FBS) al 5% (v/v), L-glutamina a 2 mM, 100 U/ml de antibiótico combinado (penicilina y estreptomycin) y una solución de aminoácidos MEM non-essential (1/100), para alcanzar una concentración de 300.000 células/ml. Para la realización de los análisis funcionales se sembraron las neuronas en placas de 6 o 96 pozos, y en el caso de los ensayos de inmunocitoquímica y ligación por proximidad en placas de 12 pozos con cubreobjetos. Todas las placas fueron previamente pretratadas con Poli-D-Lisina (Thermo Fisher Scientific (Paisley, RU) diluida en ácido bórico (150 mM) (Panreac, Barcelona, España). Pasadas 24 h, el medio de cultivo se sustituyó por medio fresco Neurobasal (Thermo Fisher Scientific (Paisley, RU) suplementado con B-27 al 2% (v/v), 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de antibiótico combinando (penicilina y estreptomycin) y una solución de aminoácidos MEM no esenciales (1/100). Todos los suplementos anteriores fueron adquiridos en Thermo Fisher Scientific (Paisley, RU). Las células se mantuvieron a 37 °C, en un 5% de CO₂ y una atmósfera húmeda un mínimo de 12 días.

3.2.3. Obtención de cultivos primarios de astrocitos

Para la obtención de cultivos primarios de astrocitos se utilizaron ratas Sprague-Dawley de 2 días de vida (P2). La extracción y disección de la corteza se realizó seguida de la disgregación mecánica mediante pipeteo con pipetas estériles de 10 ml en HBSS filtrado, del inglés *Hanks Balanced Salt Solution*, (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.34 mM Na₂HPO₄, 0.44 mM KH₂PO₄, 1.26 mM CaCl₂, 0.4 mM MgSO₄, 0.5 mM MgCl₂, and 10 mM HEPES, pH 7.4). Seguidamente se filtró la muestra por una malla de 100 µm, se centrifugó (10 minutos, 200 g) y resuspendió el pellet obtenido en medio no suplementado y se centrifugó de nuevo (10 minutos, 200 g). Este pellet se resuspendió en medio DMEM suplementado con FBS (10%) para alcanzar una concentración de 300.000 células/ml. Para los análisis funcionales se sembraron los astrocitos en placas de 6 o 96 pozos, y en el caso de los ensayos de inmunocitoquímica y ligación por proximidad en placas de 12 pozos con cubreobjetos. Tras 5 días en cultivo, las placas fueron agitadas horizontalmente durante 4 horas a 37 °C en un 5% de CO₂ y una atmósfera húmeda. Finalmente, el medio de cultivo se sustituyó por medio fresco tras 24 horas en cultivo, y tras 6 días en cultivo. Las células se mantuvieron a 37 °C en un 5% de CO₂ y una atmósfera húmeda, un mínimo de 12 días.

3.3. Modelos animales

3.3.1. Ratón modelo de esclerosis múltiple

Se utilizaron ratones macho C57BL/6 de 8 semanas de edad, con un peso de entre 20 y 24 gramos. Los animales se mantuvieron en estantes ventilados por presión positiva a 25±1 °C con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Se alimentaron *ad libitum* con pienso molido estándar (Teklad 2014s, EnVigo), permitiéndoles acceso libre a agua filtrada e irradiada con luz ultravioleta (UV) de manera previa a los experimentos. Todos los procedimientos, así como el cuidado de los animales se llevaron a cabo en acuerdo con las regulaciones europeas y españolas (86/609/CEE; RD1201/2005) y fueron aprobadas por el comité de ética de la investigación de la Universidad de Oviedo y la Consejería de Agroganadería y Recursos Autóctonos del Principado (PROAE14/2016).

3.3.1.1. Administración de cuprizona

En primer lugar, los animales fueron aclimatados, con anterioridad a los experimentos, y enjaulados de manera individual durante 7 días. Las condiciones estándar del laboratorio relativas a los ciclos luz/oscuridad, temperatura, humedad relativa y acceso libre a comida y agua se mantuvieron durante la totalidad del estudio. Para generar los diferentes grupos experimentales los animales fueron agrupados de manera aleatoria en 4 grupos. Los grupos experimentales se determinaron en función del tiempo que fueron alimentados con pienso molido estándar conteniendo 0.25% (p/p) de bis(cyclohexanona)oxaldihidrazona (CPZ)(C9012-25G, Sigma-Aldrich, MO, EE.UU.): animales alimentados con CPZ durante 3 semanas (C3), animales alimentados con CPZ durante 6 semana (C6), animales alimentados con pienso sin CPZ durante 3 semanas (U3) o bien 6 semanas (U6). Los animales fueron pesados cada dos días, así como se midió su consumo de agua. Los ratones fueron sacrificados un día tras la finalización del tratamiento con CPZ.

3.3.1.2. Obtención del tejido y marcaje histoquímico

Las muestras del tejido cerebral se obtuvieron tras la perfusión intracardiaca con paraformaldehído (PFA) al 4% en tampón fosfato, retirando el cráneo, y procediendo a una post-fijación de 12 a 18 horas en PFA al 4%. Secciones transversales de 5 µm de grosor al nivel de Bregma [0-0.3] fueron montadas en portaobjetos SuperFrost plus (Thermo Fisher Scientific, Paisley, RU) y secadas a 36 °C durante 24 horas.

3.4. Ensayo inmunocitoquímico

El ensayo inmunocitoquímico se usa ampliamente para determinar la localización y la expresión de proteínas en diversos compartimentos celulares. Se caracteriza por el marcaje de proteínas u otros componentes celulares utilizando anticuerpos conjugados a un fluorocromo o a un enzima, que en presencia de su sustrato cataliza una reacción que genera un producto con un color característico (Figura 13).

3.4.1. Colocalización de receptores

Células HEK-293T o CHO fueron transfectadas con los constructos A₁R-Rluc y CB₁R-YFP, A₁R-Rluc y A_{2A}R-YFP o bien N1R-Rluc, NR2B y CB₁R-YFP (0,5 µg/pozo de cada ADNc). 48 horas después de la transfección las células fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 15 minutos. Seguidamente se realizaron dos lavados con una solución de PBS-Glicina (20 mM). Se permeabilizaron las muestras mediante una solución de PBS-Glicina (20 mM) con Tritón X-100 (0.05%) durante 5 minutos. El bloqueo se realizó durante una hora a temperatura ambiente usando PBS-BSA 1% (albúmina de suero bovino) previo a la incubación con el anticuerpo murino primario contra Rluc (1/100) (MAB4400, Millipore, Merck, Alemania) durante 1 h y la subsecuente incubación con el anticuerpo secundario conjugado a Cy3 durante 2 h más a temperatura ambiente. Las muestras fueron lavadas con PBS y montadas usando el medio no permanente Epredia™ Immu-Mount™ adquirido en Thermo Fisher Scientific (Paisley, RU). Las muestras fueron observadas con el microscopio confocal Zeiss LSM 880 (Zeiss, Jena, Alemania).

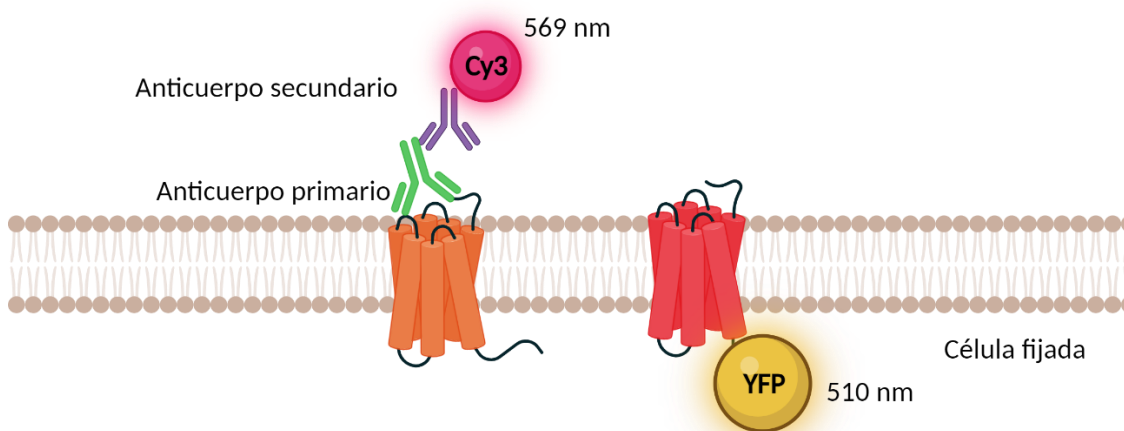


Figura 13. Esquema representativo del ensayo inmunocitoquímico combinado con la detección de fluorescencia directa para la determinación de la colocalización de dos estructuras. [Abreviaturas en figura: Proteína fluorescente amarilla (YFP)]

3.4.2. Detección de GFAP

Cultivos primarios de astrocitos de rata Sprague-Dawley (P2) fueron tratados durante 48 horas con LPS (0,01%) (v/v) o vehículo. Los tratamientos con CPZ (100 nM), así como con los agonistas específicos de A₁R y A_{2A}R, CPA (100 nM) o PSB777 (100 nM), respectivamente, se realizaron 24 horas antes de su fijación. Las muestras se fijaron usando PFA al 4% durante 15 minutos. Seguidamente se realizaron dos lavados con una solución de PBS-Glicina (20 mM). Se permeabilizaron las muestras mediante una solución de PBS-Glicina (20 mM) con Tritón X-100 (0.05%) durante 15 minutos. El bloqueo se realizó durante 1 hora a RT usando PBS-BSA al 1%. A continuación, las muestras fueron incubadas con el anticuerpo de cabra

contra la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP) (ref. PAS-18598 de Thermo Fisher Scientific, Paisley, RU) (1:100) durante 1 hora a RT y la subsecuente incubación con el anticuerpo secundario contra cabra conjugado a Cy3 (ref. 17670367 de Thermo Fisher Scientific, Paisley, RU) durante 2 horas a RT. La tinción nuclear se realizó usando Hoechst (1/100). Las muestras fueron lavadas con PBS y montadas usando el medio no permanente EpreDia™ Immu-Mount™ adquirido en Thermo Fisher Scientific (Paisley, RU). Las muestras fueron observadas con el microscopio confocal Zeiss LSM 880 (Zeiss, Jena, Alemania).

3.5. Transferencia de energía resonante bioluminiscente (BRET)

La técnica de transferencia de energía resonante bioluminiscente (BRET) se utiliza para determinar la interacción específica entre dos proteínas, determinando una proximidad inferior a 10 nm. La técnica utiliza proteínas de fusión: una formada por la primera proteína de estudio y el donante bioluminiscente Renilla luciferasa (Rluc) y otra por la segunda proteína de estudio el aceptor fluorescente YFP. La actividad oxidante de la Rluc ante la estimulación de las células con el sustrato de la Rluc, Coelenteracina H, emite una señal (480 nm). En el caso de encontrarse a una distancia inferior a 10 nm, la proteína fluorescente YFP será excitada emitiendo una señal (510 nm) que demuestra la interacción entre ambas proteínas de estudio (Figura 14).

Células HEK-293T o CHO fueron transfectadas con cantidades constantes de los ADNc correspondientes a A₁R-Rluc (0,2 µg), A_{2A}R-Rluc (0,2 µg) o N1R-Rluc (0,2 µg) -junto a NR2B- y cantidades crecientes de los ADNc correspondientes a CB₁R-YFP (0,1-1,2 µg) o A_{2A}R-YFP (0,1-1,2 µg). Para los controles negativos, se usaron cantidades constantes de D₁R-Rluc (0,2 µg) o de 5-HT_{2B}R-YFP (0,1-1,2 µg). La concentración de proteína de las muestras fue determinada y ajustada (0,2 mg/mL) mediante el ensayo de Bradford (Bio-rad, Munich, Alemania) utilizando diluciones de BSA como estándar. Para la cuantificación de la expresión de la proteína fusionada a YFP, se midió la fluorescencia de las células en suspensión (20 µg de proteína) en microplacas de 96 pozos (placas negras con fondo transparente de Porvair, Fareham, RU) usando el lector Mithras LB 940 (Berthold technologies, Baden-Wurtemberg, Alemania) usando un filtro de longitud de onda de emisión de 485 nm. La señal de BRET se determinó 1 minuto tras la adición de Coelenteracina H (5 µM) (PJK GMBH, Alemania) usando el lector Mithras LB 940 (Berthold technologies, Baden-Wurtemberg, Alemania) permitiendo la integración de ambas señales: la longitud de onda corta mediante el filtro de 485 nm (440-500 nm) y la longitud de onda larga a 530 nm (510-590 nm). Para la cuantificación de la expresión de la proteína fusionada a Rluc, las medidas se realizaron 10 minutos tras la adición de Coelenteracina H usando el lector Mithras LB 940 (Berthold technologies, Baden-Wurtemberg, Alemania) usando un filtro de longitud de onda de emisión de 530 nm. El BRET neto se define como [(la longitud de onda larga)/(la longitud de onda corta)]-Cf, el Cf corresponde a: [(la longitud de onda larga)/(la longitud de onda corta)] para las muestras que tan solo expresan el constructo que contiene la Rluc. Los valores de BRET para interacciones específicas se muestran en mili unidades de BRET (mBU) siendo estas [BRET neto x 1000].

3.5.1. Ensayo de reclutamiento de β-Arrestina II

Para determinar el reclutamiento de β-Arrestina II se procedió a realizar ensayos de BRET en células HEK-293T que expresaban A₁R-YFP, CB₁R y β-Arrestina II-Rluc (0,4 µg de ADNc, 0,2 µg de ADNc y 0,2 µg de ADNc, respectivamente) o bien CB₁R-YFP, NR1, NR2B y β-Arrestina II-Rluc (1 µg de ADNc, 0,5 µg de ADNc, 0,5 µg de ADNc y 0,5 µg de ADNc, respectivamente). Las células se resuspendieron y ajustaron a una concentración proteica

de 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y se plaquearon en microplacas de 96 pozos (placas negras con fondo transparente de Porvair, Fareham RU). Las muestras fueron pretratadas con los antagonistas específicos indicados: DPCPX (10 nM) para A_1R , Rimonabant (o SR141617, 1 μM) para CB_1R o MK-801 (1 μM) para NMDAR durante 10 minutos y consecuentemente se trataron con los agonistas selectivos: R-PIA (100 nM) para A_1R , ACEA (100 nM) para CB_1R o NMDA (15 μM) para NMDAR, justo antes de la adición de Coelenteracina H (5 μM) (PJK GMBH, Alemania). La señal de BRET entre β -Arrestina II-Rluc y el receptor-YFP se determinó usando el lector Mithras LB 940 (Berthold technologies, Baden-Wurtemberg, Alemania), permitiendo la integración de ambas señales: la longitud de onda corta mediante el filtro de 485 nm (440-500 nm) y longitud de onda larga a 530 nm (510-590 nm). Para la cuantificación de la expresión de proteína fusionada a Rluc las medidas se realizaron 10 minutos tras la adición de Coelenteracina H.

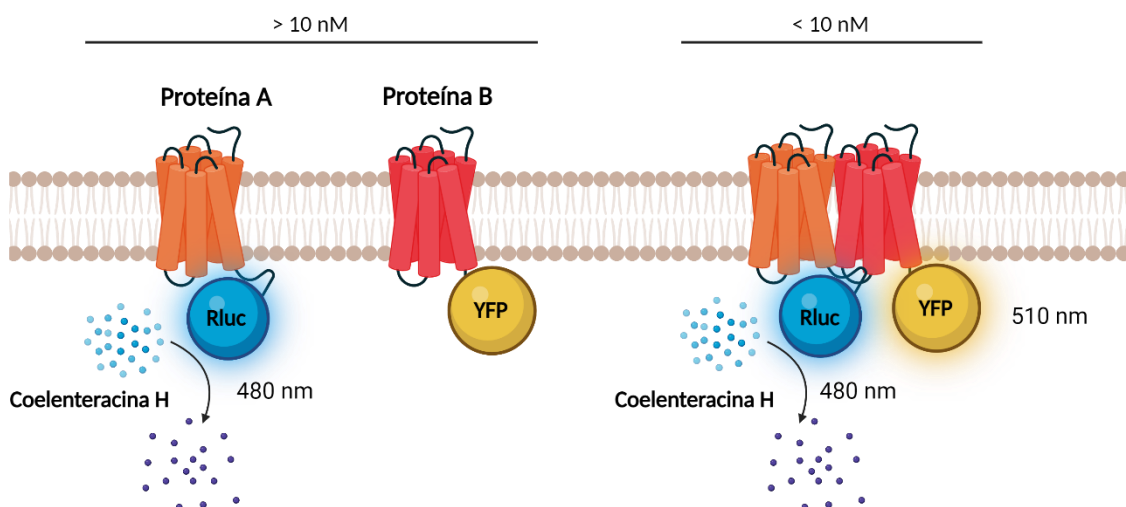


Figura 14. Esquema de la técnica de transferencia de energía resonante bioluminiscente para la detección de la interacción específica entre dos receptores de membrana. [Abreviaturas en figura: Renilla Luciferasa (Rluc), Proteína fluorescente amarilla (YFP)]

3.6. Determinación de la acumulación de AMPc intracelular

La determinación de la acumulación de AMPc intracelular es un inmunoensayo basado en la transferencia de energía resonante fluorescente homogénea resuelta en el tiempo (HTRF). Esta técnica utiliza anticuerpos monoclonales conjugados con un fluoróforo específico (Ulight™ dye) que reconocen las moléculas de AMPc. El ensayo se basa en la competición entre el AMPc presente en la muestra y el AMPc marcado con europio (Eu-AMPc) del kit para unirse a los anticuerpos conjugados (Figura 15). La excitación del europio (320-340 nm) emite una señal fluorescente (615 nm). Los anticuerpos conjugados que reconocen las moléculas de Eu-AMPc experimentan una transferencia de energía emitiendo una señal fluorescente detectable (665 nm). El AMPc de la muestra compite por la unión al anticuerpo marcado, disminuyendo la señal de transferencia de energía. Por lo que permite determinar incrementos y descensos de AMPc intracelular inducidos por la activación de las proteínas Gs y Gi, respectivamente.

La determinación de AMPc intracelular se realizó en células HEK-293T, en células CHO y en cultivos primarios de neuronas corticales, hipocámpales y estriatales y astrocitos, utilizando el Lance®Ultra AMPc kit (PerkinElmer, MA, EE.UU.). Las líneas celulares indicadas fueron

transfectadas transitoriamente con los ADNc correspondientes a A₁R, CB₁R o A_{2A}R (1 µg de ADNc para cada receptor). Cuando se indica, los atrociitos en cultivo fueron tratados durante 48 horas antes del inicio del experimento con LPS (0,01%) (v/v). Dos horas antes de realizar el experimento, el medio de cultivo fue sustituido por medio no suplementado. Las células fueron transferidas a placas blancas de 384 pozos ProxiPlate conteniendo 2500 células/pozo (Thermo Fisher, Paisley, RU) tras resuspenderlas en medio de crecimiento suplementado con Zardaverina (50 µM) (Sigma-Aldrich, MO, EE.UU.). A continuación, las células fueron pretratadas 15 minutos con los antagonistas selectivos indicados: DPCPX (10 nM) para A₁R, Rimobabant (o SR141617) (1 µM) para CB₁R, SCH58261 (1 µM) para A_{2A}R, PSB-10 (1 µM) para A₃R o MK-801 (1 µM) para NMDAR. A continuación, se trataron con los agonistas selectivos R-PIA (100 nM) o CPA (100 nM) para A₁R, ACEA (100 nM) para CB₁R, 2-Cl-IBMECA para A₃R (100 nM), CGS21680 para A_{2A}R o NMDA (15 µM) para NMDAR durante un nuevo periodo de 15 minutos. Finalmente, las células se trataron con el compuesto de origen vegetal Forskolina (0,5 µM). La Forskolina (FK) es capaz de promover la actividad de la enzima adenilato ciclasa, aumentando los niveles de AMPc intracelulares. Su uso en esta técnica permite detectar las disminuciones inducidas por la activación de receptores acoplados a proteína Gi. La reacción se detiene, finalmente, al añadir el “Eu-AMPc tracer” y el anticuerpo monoclonal “UlightAMPc”. La lectura mediante transferencia de energía fluorescente homogénea con resolución temporal (HTRF) se tomó después de una hora de incubación a RT siguiendo las instrucciones del Lance Ultra AMPc kit (PerkinElmer, MA, EE.UU.). Las lecturas de fluorescencia a 665 nm fueron obtenidas mediante el lector de placas PHERAstar Flagship equipado con un módulo óptico específico para HTRF (BMG LabTechnologies, Offenburg, Alemania).

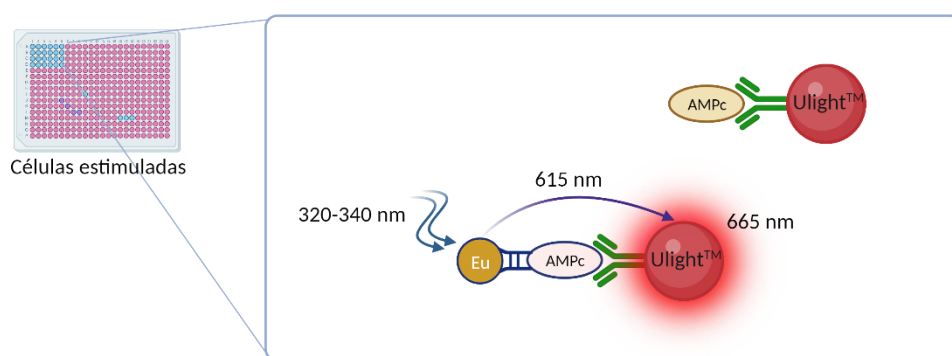


Figura 15. Esquema representativo de la técnica de detección por competición de AMPc intracelular. [Abreviaturas en figura: Europio (Eu), Adenosín monofosfato cíclico (AMPc)]

3.7. Determinación de la fosforilación de MAPK

3.7.1. Determinación de la fosforilación de ERK1/2 mediante *western blot* (WB)

La determinación de la fosforilación de MAPK mediante la técnica de *western blot* permite analizar las variaciones en los niveles de las proteínas MAPK fosforiladas ante diferentes condiciones experimentales o tratamientos. La separación de la porción proteica intracelular de las muestras mediante electroforesis ofrece una base física sobre la que realizar la detección de las proteínas de interés mediante anticuerpos específicos. En este caso, se usan dos anticuerpos específicos contra ERK1/2 no fosforiladas y contra ERK1/2

fosforiladas. El uso de anticuerpos secundarios conjugados con un fluoróforo nos permite su detección y cuantificación mediante tecnología infrarroja (Figura 16).

Para llevar a cabo los experimentos de determinación de la fosforilación de MAPK realizados en líneas celulares estables, HEK-293T y CHO transfectadas como con los ADNc correspondientes a A₁R, CB₁R o A_{2A}R (1,5 µg de cada) se utilizó la técnica de *Western blot*. Dos horas previas al experimento, el medio de cultivo fue sustituido por medio sin suplementar. Las células fueron pretratadas con los antagonistas selectivos (DPCPX (10 nM) para A₁R, Rimonabant (o SR141617) (1 µM) para CB₁R, SCH58261 (1 µM) para A_{2A}R) durante un periodo de 10 minutos; con el subsiguiente tratamiento con los agonistas selectivos R-PIA (100 nM) o CPA (100 nM) para A₁R, ACEA (100 nM) para CB₁R, o CGS21680 para A_{2A}R durante un período adicional de 7 minutos. La estimulación de las muestras se detuvo rápidamente mediante un lavado con PBS frío. A continuación, las células fueron lisadas mediante el tratamiento químico con 250 µl de tampón de lisis y una lisis mecánica mediante raspado. Tras una centrifugación (5 minutos, 13000 g a 4 °C) el contenido proteico fue determinado usando el Pierce *BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher, Paisley, RU). Para determinar la fosforilación de ERK1/2, cantidades equivalentes de proteína (10 µg) fueron separadas mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de SDS-Poliacrilamida (10%). Tras la transferencia a membranas de PVDF-FL y el bloqueo de estas usando el Odyssey blocking buffer (LI-COR Biosciences, NE, EE.UU.) durante 1 hora, las membranas fueron incubadas con una mezcla de los anticuerpos de ratón contra phospho-ERK1/2 (1:2500, Sigma-Aldrich) y de conejo contra ERK1/2 (1:40,000, Sigma-Aldrich, MO, EE.UU.) a 4 °C ON. Las bandas de 42 y 44 KDa correspondientes a ERK1 y ERK2 se visualizaron gracias al uso de los anticuerpos IRDye 800 (contra ratón) (1:10,000, Sigma-Aldrich, MO, EE.UU.) y IRDye 680 (contra conejo) (1:10,000, Sigma-Aldrich, MO, EE.UU.), incubados durante 2 horas a RT. Tras los lavados pertinentes, las membranas fueron escaneadas mediante el lector Odyssey infrared scanner (LI-COR Biosciences). La intensidad de las bandas fue cuantificada mediante los *softwares* Image Studio™ y Fiji/ImageJ.

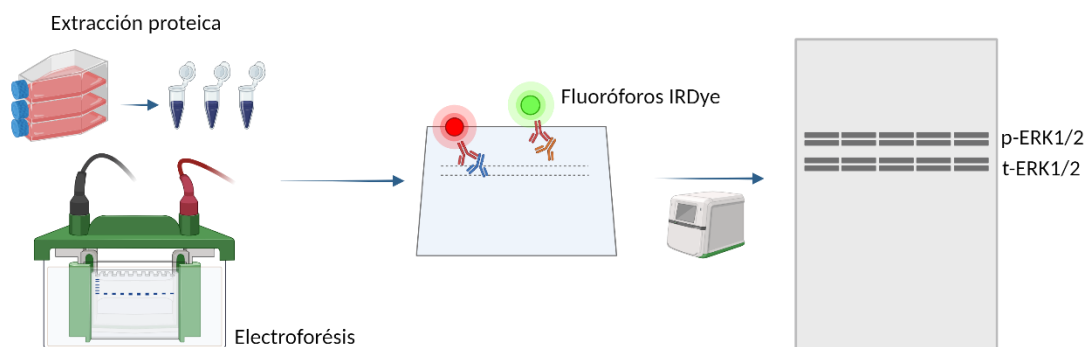


Figura 16. Representación esquemática del protocolo para la detección de la fosforilación de MAPK mediante electroforesis y *western blot*.

3.7.2. Determinación de la fosforilación de ERK1/2 mediante inmunoensayo

La determinación de la fosforilación de ERK1/2 se basa en ensayos de amplificación por proximidad de luminiscencia homogénea (AlphaScreen®). Se utilizan dos tipos de microesferas: la donante y la aceptora. La microesfera donadora se encuentra recubierta de estreptavidina capaz de unirse a un anticuerpo específico biotinilado que reconoce las ERK1/2 fosforiladas. La microesfera aceptora se encuentra conjugada a otro anticuerpo específico contra ERK1/2 fosforiladas. La excitación (680 nm) de la microesfera donadora es capaz de convertir el oxígeno presente en un singlete de oxígeno reactivo que

químicamente producirá la emisión (520-620 nm) de la microesfera aceptora, si ambas microesferas se encuentran a una distancia inferior a 200 nm (Figura 17). Por lo tanto, la señal detectada en la lectura es directamente proporcional a la cantidad de proteína fosforilada en la muestra.

Para la determinación de la fosforilación de ERK1/2 en células HEK-293T, cultivos primarios de neuronas corticales, hipocámpales y estriatales o astrocitos, las células fueron sembradas en placas transparentes de 96 pocillos (Deltalab, España) dos días en el caso de células HEK-293T transfectadas o 12 días en el caso de cultivos primarios. Cuando se indica, los cultivos primarios de astrocitos fueron tratados durante 48 horas con LPS (0,01%) (v/v). 2 horas antes de realizar el experimento se sustituyó el medio de crecimiento por medio sin suplementar. Las neuronas corticales o astrocitos fueron pretratadas con los antagonistas selectivos (DPCPX (10 nM) para A₁R, Rimonabant (o SR141617) (1 μM) para CB₁R, SCH58261 (1 μM) para A_{2A}R o MK-801 (1 μM) para NMDAR) durante un periodo de 10 minutos; con el subsiguiente tratamiento con los agonistas selectivos R-PIA (100 nM) o CPA (100 nM) para A₁R, ACEA (100 nM) para CB₁R, CGS21680 (100 nM) para A_{2A}R y/o NMDA (15 μM) para NMDAR durante un periodo adicional de 7 minutos. A continuación, las muestras fueron lavadas dos veces con PBS frío previamente a la adición de tampón de lisis (30 μl/pozo, kit de detección AlphaScreen® SureFire® kit (PerkinElmer, MA, EE.UU.) (1:5)). Tras 15 minutos en agitación horizontal, 10 μl del sobrenadante de cada condición se transfirieron a placas blancas de 384 pozos ProxiPlate (Thermo Fisher, Paisley, RU). La determinación de la fosforilación de ERK1/2 se realizó siguiendo las indicaciones del proveedor. Incubando las muestras, en primer lugar, con un anticuerpo contra ERK1/2 durante 2 horas, seguido de la incubación con un anticuerpo contra ERK1/2 fosforiladas 2 horas. Las lecturas se realizaron con el lector de placas EnSpire® Multimode Plate Reader (PerkinElmer, MA, EE.UU.).

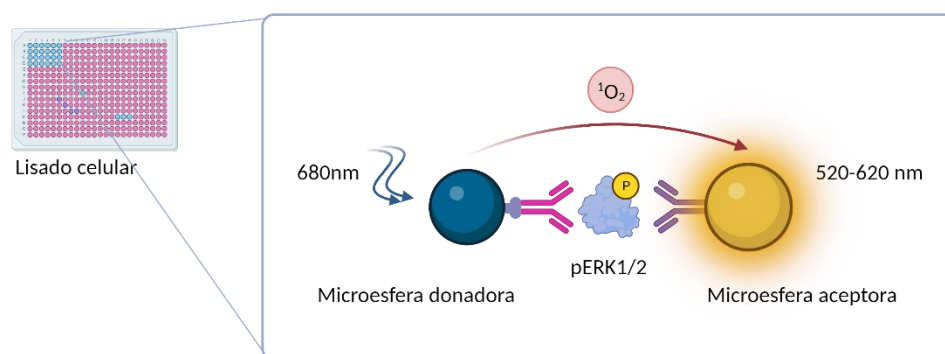


Figura 17. Representación esquemática del protocolo para la detección de la fosforilación de MAPK mediante el uso de un kit de inmunoensayo.

3.8. Ensayos de liberación de calcio

Uno de los mensajeros secundarios más comunes del metabolismo celular es el ion calcio. El ensayo de liberación de calcio se basa en el uso de un sensor de calcio: el GCaMP6 (Ding et al, 2014) (Figura 18). Este sensor consiste en una calmodulina modificada que se halla fusionada a una proteína verde fluorescente (GFP). Cuando la calmodulina une un ion calcio sufre un cambio conformacional que permite el aumento de fluorescencia de la GFP (480 nm). El uso de este y otros sensores permite evaluar la acumulación de calcio intracelular.

que proviene del retículo endoplásmico o tras la acción de canales iónicos de la membrana plasmática.

Para la determinación de la liberación de ion calcio, células HEK-293T fueron transfectadas con los ADNc correspondientes a CB₁R (0,3 µg), NR1 (0,5 µg), NR2B (0,5 µg) y el sensor de calcio GCaMP6 (0,5 µg) usando el método de transfección de PEI. 48 horas tras al transfección, las células se incubaron en Locke's buffer sin magnesio a pH 7.4 (154 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 3.6 mM NaHCO₃, 2.3 mM CaCl₂, 5.6 mM glucosa y 5 mM HEPES) suplementado con glicina 10 µM y fueron pretratadas con los antagonistas selectivos (Rimonabant (o SR141617) para CB₁R o MK-801 para NMDAR) durante 10 minutos. Con la consecuente estimulación con los agonistas de los receptores CB₁R y NMDAR, ACEA y NMDA, respectivamente, justo antes de iniciar la lectura. La intensidad de emisión fluorescente del GAMPc6 fue registrada a 515 nm tras la excitación a 488 nm en el lector de placas EnSpire®Multimode Plate Reader durante 450 segundos, tomando lecturas de 100 flashes por pocillo cada 15 segundos.

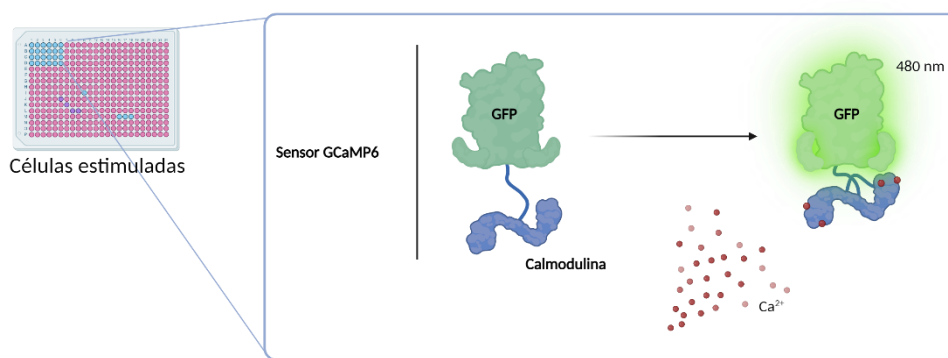


Figura 18. Representación gráfica del funcionamiento del sensor de calcio GAMPc6 para la determinación de la liberación de calcio. [Abreviaturas en figura: proteína fluorescente verde (GFP), catión calcio (Ca²⁺)]

3.9. Ensayos de ligación por proximidad (PLA)

Los ensayos de ligación por proximidad permiten determinar la interacción entre dos proteínas a nivel celular, basándose en la proximidad cercana de ambas estructuras. La técnica de PLA permite determinar la interacción entre dos proteínas que se encuentren a una distancia inferior a 40 nm. Mediante el uso de anticuerpos primarios específicos contra las proteínas de interés, los cuales serán reconocidos por unos anticuerpos secundarios marcados con oligonucleótidos. En caso de encontrarse a una distancia inferior de 40 nm, en presencia de un tercer oligonucleótido y enzimas (ligasa y polimerasa) se dará la amplificación en círculo rodante para generar una señal específica fluorescente que se detectará, en nuestro caso, como puntos rojos (624 nm) (Figura 19).

Los ensayos de ligación por proximidad se realizaron con el Duolink in situ PLA detection Kit (Sigma Aldrich, MO, EE.UU.) siguiendo las indicaciones del distribuidor. Los cultivos primarios de neuronas corticales, hipocampales y estriatales o de astrocitos se cultivaron sobre cubreobjetos de cristal (VWR, Barcelona, España). Cuando se indica, los cultivos primarios de astrocitos fueron tratados durante 48 horas antes de su fijación con LPS (0,01%) (v/v). Las secciones de cerebros de ratones tratados con cuprizona (CPZ) o vehículo, fueron montadas en portaobjetos de cristal SuperFrost plus (Thermo Fisher Scientific, Paisley, RU). Todas las muestras fueron fijadas usando PFA al 4% durante 15

minutos, lavadas con una solución de PBS-Glicina (20 mM) para la extinción de radicales aldehído libres, y permeabilizadas con una solución de PBS-Glicina (20 mM) con Tritón X-100 (0.05%) durante 15-20 minutos. A continuación, las muestras fueron lavadas con PBS y bloqueadas durante 1 hora en una cámara húmeda (en la cual permanecerán a partir de este paso) con el tampón de bloqueo facilitado por el kit comercial Duolink in situ PLA detection Kit (Sigma Aldrich, MO, EE.UU.). Las muestras fueron incubadas con una mezcla de los anticuerpos de ratón contra CB₁R (1/100) (ref. sc-293419 de Santa Cruz, CA, EE.UU.) y de conejo contra A₁R (1/100) (ref. PA3-041, de Thermo Fisher Scientific, Paisley, RU) o de conejo contra A₁R y de ratón contra A_{2A}R (1/100) (ref. sc-32261, de Santa Cruz, CA, EE.UU.) o de ratón contra A_{2A}R (1/100) (ref. 05-717 de Millipore, Merck, Alemania) y de conejo contra A₃R (1/100) (ref. ab197350 de Abcam, Cambridge, RU) o de rata contra NR1 (1/200) (Millipore) y de conejo contra CB₁R (1/100) (ref. ab23703 de Abcam, Cambridge, RU) durante toda la noche a 4 °C para la detección de los complejos heteroméricos A₁R-CB₁R, A₁R-A_{2A}R, A_{2A}R-A₃R o CB₁R-NMDAR, respectivamente. Tras el lavado de las muestras una solución de PBS-Glicina (20 mM), estas fueron tratadas con las sondas comerciales que detectan los anticuerpos primarios, Duolink II PLA probe plus and Duolink II PLA probe minus (1:5), durante 1 hora. La ligación y amplificación se llevaron a cabo como indica el distribuidor. Brevemente, se incubaron la muestras durante 1 hora con la ligasa (1:40) a 37 °C en una cámara húmeda. Tras dos lavados de 5 minutos con tampón A (NaCl (0.15 M), TrizmaBase (0,01 M), Tween 20 (0,05%) pH 7.4), se incubaron con la polimerasa (1:80) 100 minutos a 37 °C en una cámara húmeda. Ambas enzimas presentes en el kit comercial Duolink in situ PLA detection Kit (Sigma Aldrich, MO, EE.UU.). La tinción nuclear se realizó usando Hoechst (1/100) y se aplicó junto a la incubación de la polimerasa. Las muestras se montaron usando el medio de montaje Epremedia™ Immu-Mount™ de Thermo Fisher Scientific (Paisley, RU) para su posterior visualización en el microscopio confocal Zeiss LSM 880 (Zeiss, Jena, Alemania). Para cada campo de visualización se realizó un imagen en un plano con los dos canales (uno por tinción) así como 3 Z-stacks con un grosor de 1 µm. La cuantificación de puntos/células con puntos fue determinada con el *software* Duolink ImageTool (Sigma Aldrich, MO, EE.UU.).

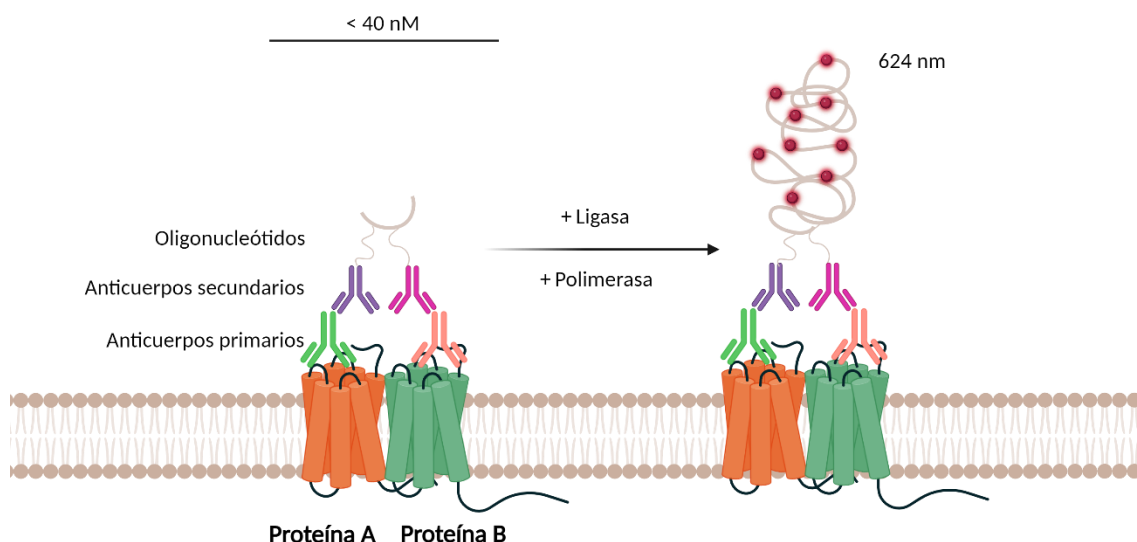


Figura 19. Esquema simplificado del ensayo de ligación por proximidad.

3.9.1. *NaveniTMTriFlex Cell MR*

El principio de la técnica NaveniTMTriFlex Cell MR permite la detección de tres señales fluorescentes: señal correspondiente a la proteína A, señal correspondiente a la proteína B y la señal correspondiente a la interacción entre ambas proteínas. Facilitando así, la determinación in situ de la proporción de receptor que forma parte del heterómero de estudio. Al igual que en el ensayo de PLA clásico, los anticuerpos secundarios Triflex Navenibodies, en el caso de que las proteínas de estudio se encuentran a una distancia inferior a 40 nm, son capaces de hibridar, en presencia de un tercer oligonucleótido, y enzimas (ligasa y polimerasa) dando lugar a la amplificación en círculo rodante de una señal específica fluorescente (670 nm). Las sondas nucleotídicas presentes en los Triflex Navenibodies serán capaces, también, de amplificarse de manera independiente de la hibridación generando dos señales fluorescentes distintivas: la de la proteína A (569 nm) y la de la proteína B (525 nm)(Figura 20).

Los ensayos de ligación por proximidad se realizaron con el NaveniTMTriFlex Cell MR (Navinci, Uppsala, Suecia) siguiendo las indicaciones del distribuidor. Las células C6 crecidas en cámaras de cultivo (Sigma Aldrich, MO, EE.UU.) fueron fijadas usando PFA al 4% durante 20 minutos, lavadas con una solución de PBS e incubadas durante 10 minutos a RT en una solución de glicina (10 nM) para la extinción de los radicales aldehído libres. La permeabilización se realizó con una solución de PBS con Tritón X-100 (0,1%) durante 30 minutos. A continuación, las muestras fueron lavados con PBS y se procedió a su incubación durante toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios de conejo contra A₁R (ref. A268, de Sigma Aldrich, MO, EE.UU.) (1:500) y de ratón contra A_{2A}R (ref. 05-717, de Sigma Aldrich, MO, EE.UU.) (1:500) diluidos en solución de bloqueo. Tras el lavado de las muestras, estas fueron tratadas con las sondas comerciales que detectan los anticuerpos primarios, Navenibody M TF (1:40) y Navenibody R TF (1:40) durante 2 horas. La ligación y amplificación se llevaron a cabo como indica el distribuidor. Brevemente, se incubaron las muestras durante 30 minutos con la ligasa (1:40) a 37 °C en una cámara húmeda. Tras dos lavados de 5 minutos con PBS, se incubaron con la polimerasa (1:40) 1 hora a 37 °C en una cámara húmeda. Ambas enzimas presentes en el kit comercial NaveniTMTriFlex Cell MR (Navinci, Uppsala, Suecia). La tinción nuclear se realizó usando Hoechst (1/100) ya presente en el medio de montaje utilizado, Duolink® In Situ Mounting Medium with DAPI (Sigma Aldrich, MO EE.UU.) para su posterior visualización en el microscopio confocal Leica TCS 4D (Leica, Wetzlar, Alemania). Para cada campo de visualización se realizó una imagen del mismo plano con los cuatro canales (uno por tinción), así como 10 Z-stacks en un grosor de 5 µm. La cuantificación de puntos/células con puntos fue determinada con el *software* Duolink ImageTool (Sigma Aldrich, MO, EE.UU.).

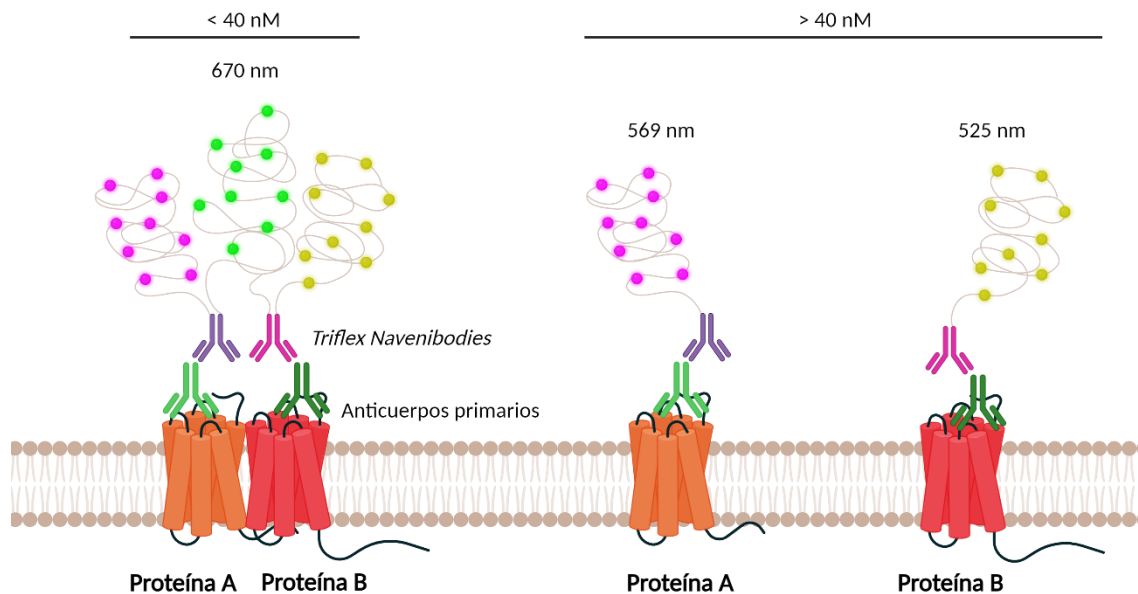


Figura 20. Esquema simplificado del ensayo de ligación por proximidad NaveniTMTriFlex Cell MR.

3.10. Análisis estadístico

Todos los análisis incluyen datos de al menos tres experimentos independientes y se representan como promedio $\pm$ SEM (error estándar del promedio). Los grupos de estudio fueron comparados mediante pruebas paramétricas T de Student o ANOVA, cuando se asumía normalidad. En experimentos de señalización, cuando la distribución de ciertos grupos se consideraba parcialmente sesgada, pruebas no paramétricas Mann-Whitney U se utilizaron para las comparaciones dos a dos. El nivel de significación utilizado fue del 5%, reajustado mediante el método Bonferroni al realizar comparaciones múltiples sin una prueba global previa. En los ensayos en los que se utilizó one-way ANOVA o two-way ANOVA, se realizó el test de Bonferroni, para comparaciones múltiples, tomando un nivel de significación del 5%. El análisis de datos, así como el estadístico se realizaron con el *software* GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Inc., EE.UU.).

A microscopic image of neurons, showing their cell bodies (soma) and branching processes (dendrites and axons) against a solid blue background. The neurons are dark, almost black, and their branching patterns are complex and interconnected. One large neuron is prominent in the upper center, while another is visible in the lower right. The overall image has a scientific, clinical feel.

RESULTADOS

4.RESULTADOS

4.1. El complejo heteromérico A₁R-CB₁R como posible nueva diana terapéutica para la Esclerosis Múltiple

4.1.1. Los receptores de adenosina A₁ y de cannabinoides CB₁ forman complejos heteroméricos en células HEK-293T transfectadas

Previamente a la demostración de la interacción entre los receptores de adenosina A₁ y de cannabinoides CB₁, nos centramos en determinar si ambos receptores se expresaban en el mismo compartimento celular. Para ello, células HEK-293T fueron transfectadas con el ADNc correspondiente a A₁R fusionado a la proteína Renilla luciferasa (Rluc) y el ADNc correspondiente a CB₁R fusionado a la proteína fluorescente amarilla (YFP). La expresión de A₁R se detectó mediante el uso de un anticuerpo primario contra Rluc, con el subsecuente uso de un anticuerpo secundario fusionado a Cy3. La expresión de CB₁R se detectó mediante la propia fluorescencia de la proteína YFP. Como se muestra en amarillo (Figura 21A), los receptores A₁ y CB₁ colocalizan a nivel de la membrana plasmática y a nivel citosólico. Aun así, dado que la colocalización no demuestra la interacción entre ambos GPCRs, se realizaron ensayos de transferencia de energía resonante bioluminiscente (BRET). Células HEK-293T fueron transfectadas con concentraciones constantes de A₁R-Rluc y crecientes de CB₁R-YFP. La curva de saturación de BRET obtenida demuestra la interacción física entre los receptores, por tanto, la existencia de los complejos heteroméricos A₁R-CB₁R en células HEK-293T transfectadas (Figura 21B,C). Como control negativo se utilizaron concentraciones constantes del receptor D₁ fusionado a Rluc y crecientes del constructo CB₁R-YFP, obteniendo una señal lineal inespecífica indicando la ausencia de interacción entre dichos receptores (Figura 21B,C).

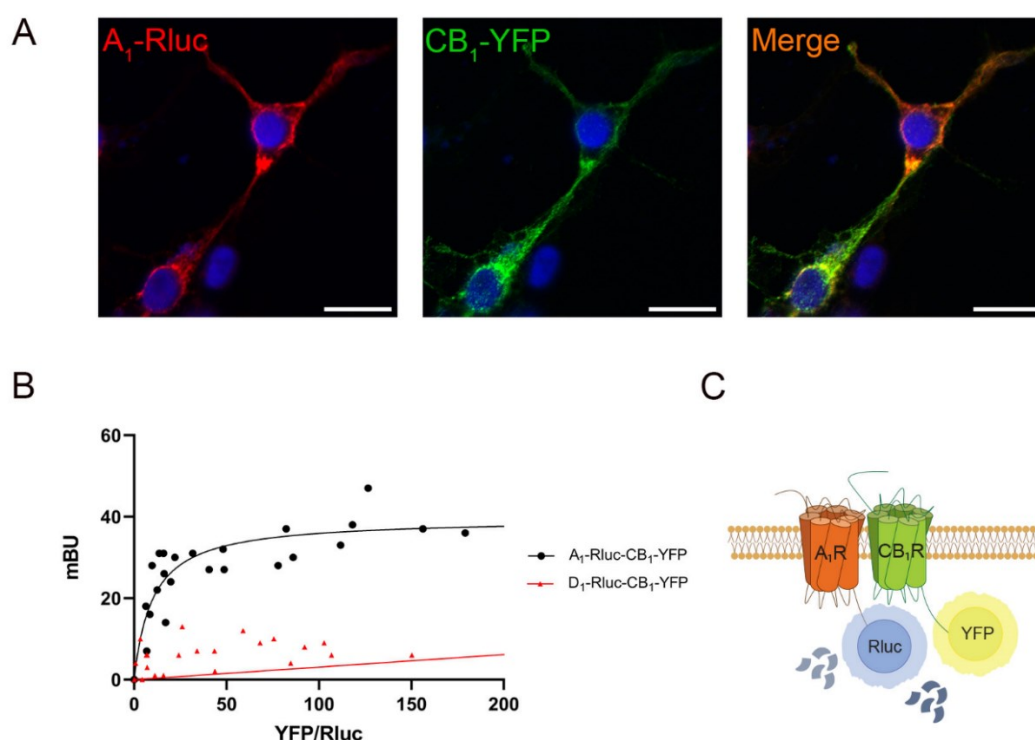


Figura 21. Interacción física entre los receptores A₁ y CB₁ en células HEK-293T transfectadas.
A Ensayo inmunocitoquímico en células HEK-293T transfectadas con los ADNc correspondientes a

A₁R-Rluc y CB₁R-YFP (0.5 µg cada uno). CB₁R-YFP fue detectado por su propia fluorescencia (verde) y A₁R-Rluc fue detectado mediante el uso de un anticuerpo primario contra Rluc en ratón, y un anticuerpo secundario contra ratón conjugado a Cy3 (rojo). La colocalización se observa en amarillo. Los núcleos fueron marcados con Hoechst (azul). Escala: 20 µm. **B** Ensayo de BRET en células HEK-293T transfectadas con concentraciones constantes del ADNc para A₁R-Rluc (0.2 µg); o cantidades constantes del ADNc para D₁R-Rluc (0.2 µg) como control negativo y concentraciones crecientes del ADNc CB₁R-YFP (0.1-1.2 µg). Los valores corresponden al promedio ± SEM de 6 experimentos independientes realizados por duplicado. **C** Esquema del ensayo de BRET.

4.1.2. El complejo heteromérico A₁R-CB₁R presenta un fenómeno de crosstalk negativo en células HEK-293T transfectadas

Tras la demostración de la formación del complejo heteromérico A₁R-CB₁R en células HEK-293T transfectadas, se planteó la caracterización de la señalización derivada de este complejo descrito por primera vez. Dado que ambos receptores, A₁ y CB₁ se acoplan a proteína G_i, y por tanto su activación conlleva la inhibición de la adenilato ciclasa, reduciendo los niveles de AMPc intracelular; en primer lugar, se analizó esta vía de señalización. Células HEK-293T se transfectaron con ambos ADNc correspondientes a la proteínas A₁R y CB₁R y fueron estimuladas con sus agonistas y /o sus antagonistas selectivos. Se observó, en primer lugar, como el agonista selectivo de A₁R, R-PIA, y el agonista selectivo de CB₁R, ACEA, disminuían significativamente los niveles de AMPc inducidos por el tratamiento con Forskolina (Figura 22A). De manera interesante, la coestimulación con ambos agonistas no mostró ningún efecto. Indicando así, que la activación de A₁R bloquea la señalización mediada por CB₁R y viceversa. Este fenómeno se conoce como crosstalk negativo, representando una útil herramienta para la identificación del complejo A₁R-CB₁R en tejido nativo. Por lo que respecta a los antagonistas, se detectó como el antagonista selectivo de A₁R, DPCPX, no tan solo fue capaz de bloquear la propia activación de A₁R, sino que también bloqueó la de CB₁R (Figura 22A). Este fenómeno, mediante al cual el antagonista de un protómero es capaz de bloquear la activación del otro protómero en el mismo complejo se conoce como crossantagonismo. Al analizar el efecto inducido por el antagonista selectivo de CB₁R, Rimonabant, se detectó de nuevo un efecto de crossantagonismo.

A₁R y CB₁R, aparte de acoplarse a proteína G_i, disminuyendo los niveles de AMPc, también activan la vía de fosforilación de MAPK mediante las subunidades βγ. Al analizar la fosforilación de ERK1/2 en células HEK-293T transfectadas, se observó cómo, ambos receptores A₁ y CB₁, presentaban una señal significativa al ser activados (Figura 22B). Además, al coestimar las células con ambos agonistas se observó un efecto no aditivo. Por lo que parece que la activación del complejo A₁R-CB₁R favorece la señalización mediante la vía indirecta de la proteína G. Al analizar el efecto de los antagonistas se observó un fenómeno de crossantagonismo similar al de la vía del AMPc.

Los GPCR, para evitar una sobreestimulación, suelen ser internalizados tras inducir su efecto a nivel celular. La familia de las β-arrestinas son pequeñas proteínas involucradas en este proceso de endocitosis de los receptores. En este sentido, nos planteamos analizar el reclutamiento de β-arrestinas tras el tratamiento con agonista y/o antagonistas específicos de A₁R y CB₁R en células transfectadas HEK-293T. Se observó un efecto de crosstalk negativo ante la coestimulación con ambos agonistas, dado que la señal obtenida era inferior a la resultante en caso de la estimulación individual de los receptores. Así mismo, un fenómeno de crossantagonismo bidireccional fue observado ante el tratamiento con los antagonistas selectivos seguido del tratamiento con agonistas (Figura 22C).

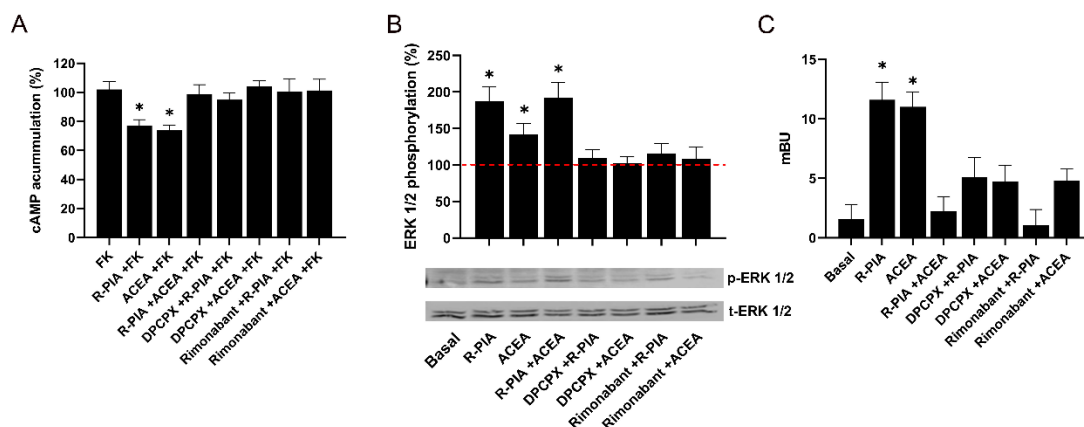


Figura 22. Caracterización funcional del complejo heteromérico A₁R-CB₁R en células HEK-293T transfectadas. **A-B** Células HEK-293T expresando A₁R y CB₁R (1 µg cada uno) fueron pretratadas con los antagonistas selectivos (DPCPX (10 nM) para A₁R o Rimonabant (1 µM) para CB₁R) y subsecuentemente estimuladas con los agonistas selectivos R-PIA (100 nM) para A₁R y/o ACEA (100 nM) para CB₁R. **A** Ensayo de determinación del AMPc citosólico realizado tras la estimulación con FK (500 nM). Los valores se normalizaron a la condición de Forskolina restándole el basal. Los datos representan el promedio ±SEM de ocho experimentos independientes realizados en triplicados. **B** Ensayo de determinación de la fosforilación de ERK1/2 mediante *western blot*. Los datos representan el promedio ±SEM de tres experimentos independientes realizados en triplicados. **C** Ensayo de reclutamiento de β-arrestinas determinado en células HEK-293T que expresan A₁R-YFP, CB₁R y β-arrestina II-Rluc (0.4 µg, 0.2 µg y 0.2 µg de ADNc, respectivamente) y pretratadas con los antagonistas selectivos (DPCPX (10 nM) para A₁R o Rimonabant (1 µM) para CB₁R) y subsecuentemente estimuladas con los agonistas selectivos R-PIA (100 nM) para A₁R y/o ACEA (100 nM) para CB₁R. Los datos representan el promedio ±SEM de ocho experimentos independientes realizados en triplicados. Pruebas no paramétricas Mann-Whitney fueron llevadas a cabo para el reclutamiento de β-arrestina II (condiciones vs basal, *p<0.007), y para la acumulación de AMPc (versus FK, *p<0.007), mientras que para la fosforilación de ERK1/2 se analizaron los resultados mediante pruebas de Wilcoxon (*p<0.05).

4.1.3. El complejo heteromérico A₁R-CB₁R se expresa en cultivos primarios de neuronas corticales

Una vez demostrada la formación del heterómero A₁R-CB₁R en un sistema heterólogo de expresión, se propuso la posibilidad de la expresión de éste en cultivos primarios de neuronas corticales, en las que se conoce se expresan ambos receptores. Para este propósito se realizaron ensayos de ligación por proximidad (PLA). Se detectaron unos 5 puntos rojos por célula con puntos y un 26.23% de las neuronas que presentaban puntos rojos (Figura 23A,B). En comparación con el control negativo, el cual se realizó en ausencia de uno de los anticuerpos primarios que presentaba 2 puntos rojos por célula con puntos y un 4.92% de las neuronas presentaban puntos rojos. Por lo que se concluye que las neuronas corticales expresan el complejo heteromérico A₁R-CB₁R. En este mismo tipo de cultivo primario se realizaron ensayos de determinación de AMPc y fosforilación de ERK1/2. En la acumulación de AMPc se observó que la activación con los agonistas específicos, R-PIA y ACEA inducía pequeños efectos significativos, mientras que la coactivación con ambos agonistas presentada un efecto no aditivo (Figura 23C). Además, se detectó un fenómeno de crossantagonismo. Resultado en consonancia con lo observado en células HEK-293T transfectadas. Finalmente, en la vía de la fosforilación de MAPK, se observaron efectos

similares. Un efecto no aditivo en la coactivación usando ambos agonistas específicos y un fenómeno de crossantagonismo al tratar los cultivos con los antagonistas previamente a los agonistas (Figura 23D). Estos datos concuerdan con la expresión del heterómero A₁R-CB₁R en neuronas corticales.

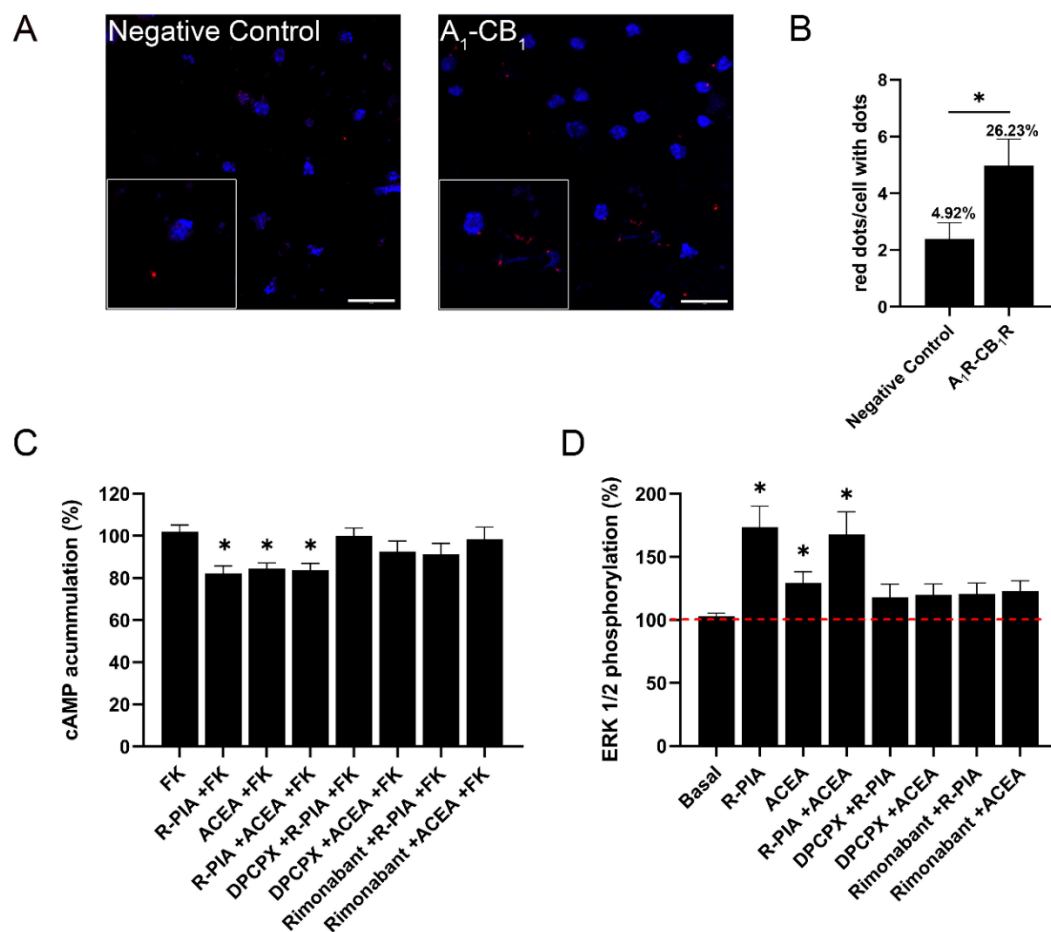


Figura 23. Expresión y caracterización de la señalización del complejo A₁R-CB₁R en cultivos primarios de neuronas corticales de ratón. **A** Ensayo de PLA para detectar la expresión del heterómero A₁R-CB₁R usando anticuerpos primarios específicos de conejo contra A₁R y de ratón contra CB₁R. El control negativo se realizó en ausencia del anticuerpo primario específico contra CB₁R. Los núcleos celulares fueron marcados con Hoechst (azul). Escala: 20 μ m. **B** Cuantificación de los puntos rojos por célula con puntos para determinar la expresión del heterómero A₁R-CB₁R en neuronas corticales. El análisis se condujo mediante el uso del software Duolink ImageTool. Los porcentajes representan las células con puntos rojos respecto al total de células. Los datos se representan como promedio $\pm$ SEM (n=10). **C-D** Ensayos de señalización realizados en neuronas corticales pretratadas con los antagonistas selectivos (DPCPX (10 nM) o Rimonabant (1 μ M) para A₁R o CB₁R, respectivamente) y subsecuentemente tratados con los agonistas selectivos (R-PIA (100 nM) y/o ACEA (100 nM) para A₁R y CB₁R, respectivamente). **C** La determinación del AMPc intracelular se determinó tras la estimulación con FK (500 nM). Los datos fueron normalizados respecto al efecto de la Forskolina. Los datos se muestran como promedio $\pm$ SEM de ocho experimentos independientes realizados en triplicados. **D** La fosforilación de ERK1/2 se determinó mediante el kit AlphaScreen® SureFire® kit (PerkinElmer). Los datos se muestran como promedio $\pm$ SEM de cuatro experimentos independientes realizados en triplicados. Pruebas no paramétricas Mann-Whitney se usaron en la acumulación de AMPc (versus FK, *p<0.007), para la fosforilación de ERK1/2 (versus basal, *p<0.007) y para la determinación de los puntos rojos/células con puntos rojos (versus el control negativo, *p<0.05).

4.1.4. La expresión del complejo heteromérico A₁R-CB₁R se ve incrementada en astrocitos activados

Los receptores de adenosina A₁ y de cannabinoides CB₁ no se expresan tan solo a nivel de neuronas, sino que también se encuentran en células gliales. Por lo que se propuso la identificación de la expresión del complejo A₁R-CB₁R en astrocitos en reposo. Como se observa en la Figura 24A, se detectaron unos 5 puntos rojos por célula con puntos en un 88.15% de astrocitos que presentaron puntos rojos, indicando la expresión del heterómero A₁R-CB₁R en astrogliá. Así mismo, se realizaron análisis de la señalización mediada por el heterómero A₁R-CB₁R. Mediante la detección de la acumulación de AMPc, se observó que la coactivación con ambos agonistas, R-PIA y ACEA, producía una señal menor a la producida por la estimulación independiente. Por lo que la activación del protómero CB₁R bloquea la señal inducida por A₁R y viceversa (Figura 24C). Este fenómeno, como se ha mencionado anteriormente, denominado crosstalk negativo podría resultar en una útil característica del complejo A₁R-CB₁R para su detección a nivel tisular. También se observó un efecto de crossantagonismo bidireccional. En el caso del análisis de la vía de las MAPK, de nuevo se observó el efecto de crosstalk negativo y de crossantagonismo inducido por el Rimonabant, antagonista de CB₁R, sobre la activación del A₁R mediante R-PIA (Figura 24E). Además, el antagonista de A₁R, DPCPX, no fue capaz de bloquear el efecto inducido por ACEA. Teniendo en cuenta el proceso neuroinflamatorio asociado a la progresión de la esclerosis múltiple (MS) y con el objetivo de profundizar en el estudio de la expresión del complejo en condiciones patológicas, se repitieron los análisis previos en astrogliá activada mediante el tratamiento con LPS durante 48 horas (0.1% (v/v)). De manera interesante, la expresión del complejo en astrogliá activada se vio aumentada en comparación con la astrogliá en reposo, detectando mediante PLA 10 puntos rojos por células con puntos en un 65.10% de los astrocitos analizados (Figura 24A). Tras el análisis de los niveles de AMPc, se observó que la activación de CB₁R inducía un efecto mayor en astrogliá activada que en las células en reposo. Probablemente, debido a la sobreexpresión de estos receptores en astrogliá activada. De todos modos, se observaron en esta vía de señalización, los fenómenos de crosstalk negativo y crossantagonismo (Figura 24D). En la vía de la fosforilación de las MAPK se detectó un efecto no aditivo al coactivar las células gliales y un fenómeno de crossantagonismo bidireccional (Figura 24F). Sugiriendo, en conjunto, un potencial como diana terapéutica del complejo A₁R-CB₁R en patologías en las que la astrogliá es activada y representa un factor clave para la respuesta inflamatoria del tejido.

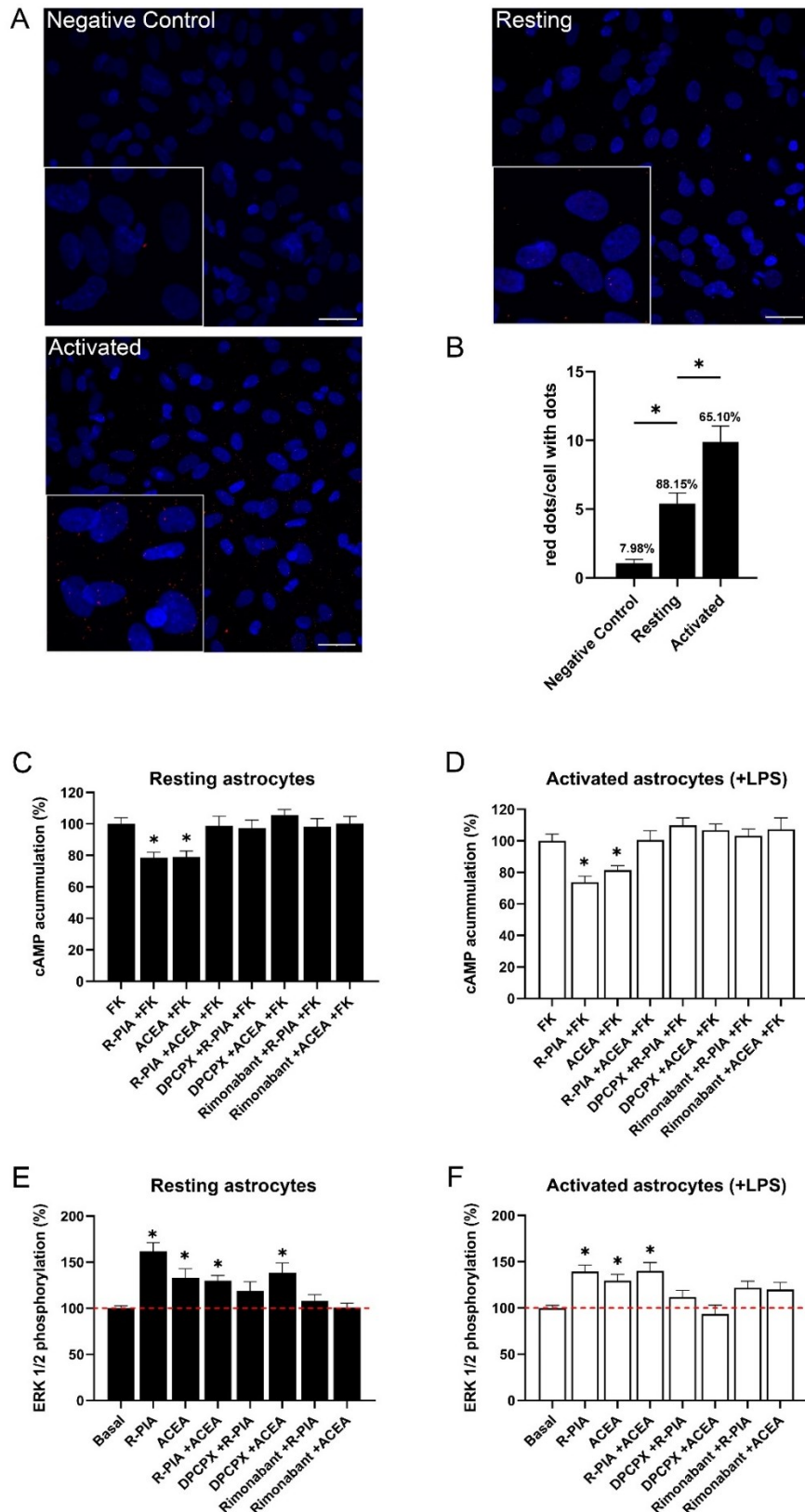


Figura 24. Expresión y señalización del complejo heteromérico A₁R-CB₁R en cultivos primarios de astrogliá de rata. A La expresión del complejo A₁R-CB₁R se detectó en cultivos primario de astrocitos de rata en reposo y activados (tratamiento con LPS 0.1% (v/v) durante 48 horas previas al experimento) mediante ensayos de ligación por proximidad usando anticuerpos primarios específicos de conejo contra A₁R y de ratón contra CB₁R. En el control negativo el

anticuerpo contra CB₁R no fue añadido. Los núcleos se marcaron con Hoechst (azul). Escala: 50 µm. **B** Cuantificación de los puntos rojos por célula con puntos para determinar la expresión diferencial del complejo A₁R-CB₁R en astrocitos. El análisis se computó usando el software Duolink Imagetool. Los porcentajes representan las células con puntos respecto las células totales del AMPc. Los datos se representan como promedio ±SEM (n=10). **C-F** Ensayos de señalización donde los astrocitos fueron pretratados con los antagonistas selectivos (DPCPX (10 nM) o Rimonabant (1 µM) para A₁R o CB₁R, respectivamente) y subsecuentemente tratados con los agonistas selectivos (R-PIA (100 nM) y/o ACEA (100 nM) para A₁R y CB₁R, respectivamente). **C-D** La determinación de los niveles de AMPc citosólico se realizaron en astrocitos en reposo y activados (tratamiento con LPS 0.1% (v/v) 48 horas previas al experimento) tras la estimulación con Forskolina (500 nM). Los datos se normalizaron respecto al efecto de la Forskolina. Los datos se representan como promedio ±SEM de seis experimentos independientes en cuádruplicados. **E-F** La fosforilación de ERK1/2 se determinó mediante el uso del kit AlphaScreen®SureFire® kit (Perkin Elmer) en astrocitos en reposo y activados (tratamiento con LPS 0.1% (v/v) 48 horas previas al experimento). Los datos se representan como promedio ±SEM de cinco experimentos independientes en triplicados para la fosforilación de ERK1/2. Pruebas no paramétricas Mann-Whitney se computaron para la acumulación de AMPc (versus la FK), fosforilación de ERK1/2 (versus el basal, *p<0.007) y para los valores de PLA (versus astrocitos en reposo, *p<0.05).

4.1.5. La expresión del complejo A₁R-CB₁R incrementa en el área cortical de ratones tratados con cuprizona

Finalmente, se determinó la expresión del complejo A₁R-CB₁R en un modelo de ratón de esclerosis múltiple. El modelo consiste en ratones alimentados durante tres (C3) o seis (C6) semanas con pienso molido estándar conteniendo un 0.25% (p/p) de CPZ (bis(ciclohexanona)-oxaldihidrazona) o bien solo pienso estándar (U3) a modo de grupo vehículo. Se detectó, en las secciones de los animales no tratados unos 5 puntos rojos por célula con un total del 42.30% de células presentando puntos rojos (Figura 25A,B). Resultados similares se observaron en animales C3, en los que se detectaron unos 7 puntos rojos por célula con un total del 61.62% de células presentando puntos rojos. Pero, en animales alimentados con CPZ durante 6 semanas (C6), se observó un aumento significativo de la cantidad de complejos (Figura 25) con 14 puntos rojos por célula con un total de 71.87% de células presentando puntos rojos. El control negativo, realizado en ausencia del anticuerpo primario específico de CB₁R, mostró como se esperaba, un descenso de los puntos rojos por célula con puntos. Presentando unos 2 puntos rojos por célula en un 12.21% de células presentando puntos. Estos resultados, apuntan al potencial terapéutico del complejo A₁R-CB₁R como posible diana a considerar en el tratamiento de la esclerosis múltiple.

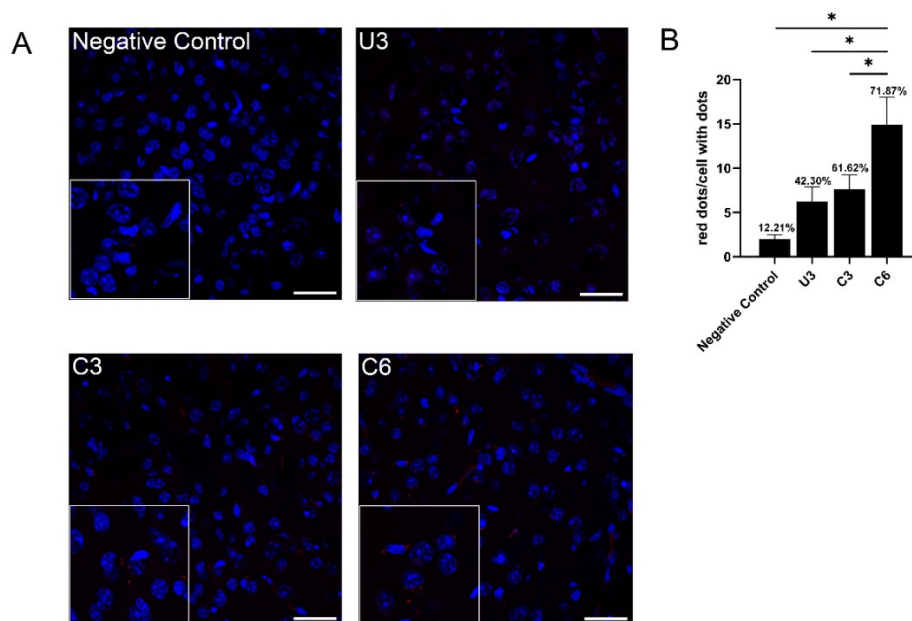


Figura 25. Expresión del complejo A₁R-CB₁R en secciones corticales de ratones tratados con cuprizona. **A** La formación del complejo heteromérico A₁R-CB₁R en áreas corticales de cerebros de ratones no tratados (U3) o tratados con cuprizona (durante 3 (C3) o seis (C6) semanas) se realizó mediante ensayos de ligación por proximidad (PLA). Se utilizaron anticuerpos primarios de conejo contra A₁R y de ratón contra CB₁R. En el control negativo no se añadió el anticuerpo específico contra CB₁R. Los núcleos se marcaron con Hoechst (azul). Escala: 20 μ m. **B** Cuantificación de la expresión diferencial del heterómero A₁R-CB₁R en áreas corticales de ratones U3, C3 y C6. Se utilizó el software Duolink ImageTool. Los porcentajes representan las células con puntos respecto el total de células en el campo analizado. Los datos se representan como promedio $\pm$ SEM (n=10). El análisis estadístico se desarrolló con pruebas no paramétricas Mann-Whitney (versus la condición C6, *p<0.05).

4.2. Implicaciones del heterómero A₁R-A_{2A}R en la Esclerosis múltiple

4.2.1. La activación del A_{2A}R bloquea la señalización del A₁R en la vía del AMPc en células CHO transfectadas

De manera previa a la demostración de la interacción específica entre los receptores de adenosina A₁ y A_{2A}, nos centramos en analizar la expresión de ambas proteínas a nivel del mismo compartimento celular. Para ello, células CHO fueron transfectadas con el ADNc de A₁R fusionado a la proteína Rluc y el ADNc de A_{2A}R fusionado a la proteína fluorescente YFP. La expresión del A₁R se detectó mediante el uso de un anticuerpo primario específico contra Rluc y el consiguiente anticuerpo secundario fusionado a Cy3. La expresión del A_{2A}R se detectó mediante la propia fluorescencia de la proteína YFP. Como se muestra en amarillo (Figura 26A) los receptores colocan a nivel de la membrana plasmática. Para la determinación de la interacción entre ambos receptores, se llevó a cabo un ensayo de BRET en células CHO transfectadas con concentraciones constantes de A₁R-Rluc y crecientes de A_{2A}-YFP. La curva de saturación de BRET obtenida demuestra la interacción física entre ambos receptores, y evidencia la formación de complejos heteroméricos A₁R-A_{2A}R en células CHO transfectadas (Figura 26B). Como control negativo se utilizaron concentraciones constantes del receptor 5-HT_{2B} fusionado a Rluc y crecientes de A_{2A}-YFP, obteniendo una

señal lineal inespecífica que indica la ausencia de interacción entre dichos receptores (Figura 26C).

Una vez determinada la interacción entre el A₁R y el A_{2A}R en células CHO transfectadas, se propuso la determinación de la señalización específica del heterómero. Dado que el receptor A₁ se acopla a proteína G_i, la determinación del AMPc intracelular se realizó en presencia de Forskolina (500 nM). El receptor A_{2A} se acopla a proteína G_s, por lo que su funcionalidad se analizó en ausencia de Forskolina. Así, en células CHO transfectadas se observó que la activación del receptor A₁ no inducía una bajada de los niveles del AMPc aumentados por el tratamiento con Forskolina. Es decir, la presencia del receptor A_{2A} bloquea la señalización del receptor A₁ cuando forman complejos heteroméricos (Figura 26D). Confirmado al detectar que el bloqueo del receptor A_{2A} mediante su antagonista selectivo posibilitó la activación del receptor A₁.

Otra vía que activan ambos receptores, A₁ y A_{2A}, es la vía de fosforilación de MAPK. En este sentido, se transfectaron células CHO con ambos receptores y se analizó la fosforilación de ERK 1/2. Se observó un aumento significativo de la fosforilación de ERK1/2 ante la activación con los agonistas selectivos de ambos receptores individualmente (Figura 26F). En el caso del tratamiento conjunto con ambos agonistas, se observó un efecto no aditivo, es decir, inferior a la suma de las activaciones individuales de ambos receptores de adenosina. Además, la activación del receptor A₁ fue bloqueada no solo ante el tratamiento con su propio antagonista selectivo, DPCPX, sino también con el antagonista selectivo de A_{2A}R, SCH58621, y viceversa. Indicando un crossantagonismo bidireccional en la vía de las MAPK.

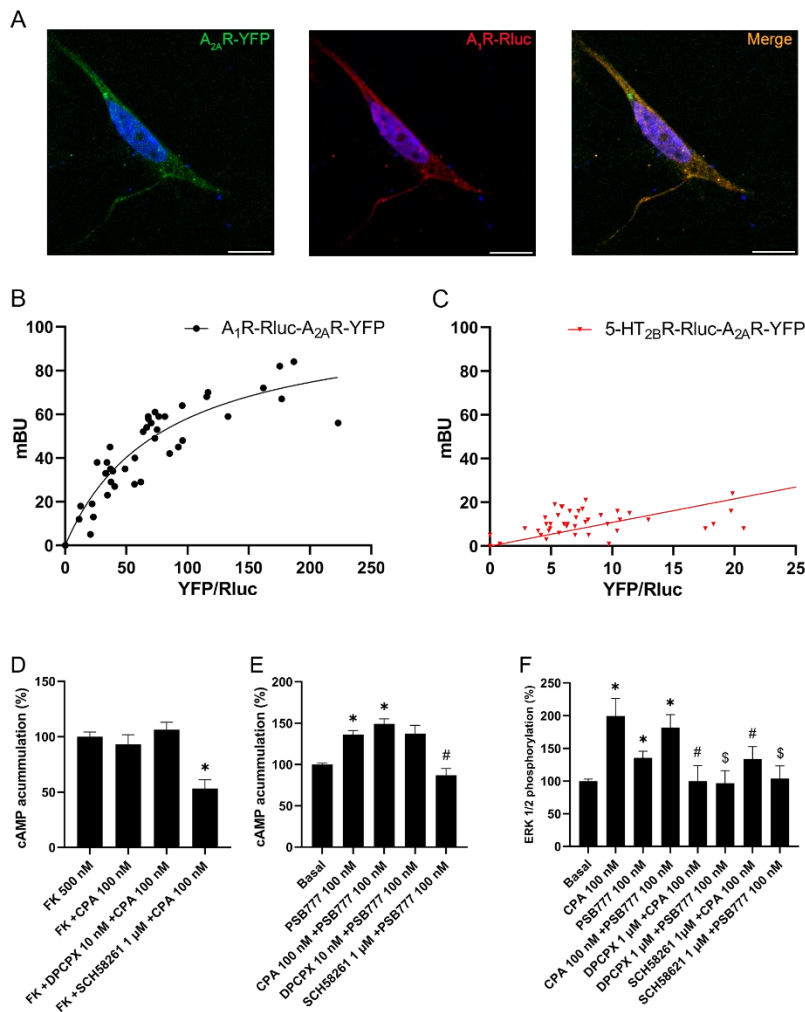


Figura 26. Formación y caracterización funcional de los complejos A₁R-A_{2A}R en células CHO transfectadas. **A** Ensayo inmunocitoquímico en células CHO transfectadas con los ADNc correspondientes a A₁R-Rluc y A_{2A}R-YFP (0.5 µg cada uno). El A_{2A}R-YFP fue detectado por la propia fluorescencia de la proteína YFP (verde) y, el A₁R-Rluc fue detectado mediante el uso de un anticuerpo primario de ratón contra Rluc, y un anticuerpo secundario contra ratón conjugado a Cy3 (rojo). La colocalización se observa en amarillo. Los núcleos fueron marcados con Hoechst (azul). Escala: 10 µm. **B** Ensayo de BRET en células CHO transfectadas con concentraciones constantes del ADNc de A₁R-Rluc (0.2 µg) y concentraciones crecientes de ADNc de A_{2A}R-YFP (0.1-1.2 µg). **C** Control negativo de BRET. Células CHO se transfectaron con cantidades constantes de ADNc para 5-HT_{2B}R-Rluc (0.2 µg) y concentraciones crecientes de ADNc para A_{2A}R-YFP (0.1-1.2 µg). Los valores corresponden al promedio ±SEM de 6 experimentos independientes realizados por duplicado. **D-F** Células CHO fueron transfectadas con los ADNc correspondientes a A₁R (1 µg) y A_{2A}R (1 µg) y pretratadas con los antagonistas selectivos DPCPX (10 nM) o SCH58621 (1 µM), para A₁R y A_{2A}R, respectivamente con la consecuente activación con los agonistas selectivos CPA (100 nM) y/o PSB777 (100nM) para A₁R y A_{2A}R, respectivamente. **D,E** La determinación de AMPc se realizó en células estimuladas con Forskolina (500 nM) (D) o vehículo (E) mediante el kit Lance Ultra AMPc (PerkinElmer). Los valores corresponden al promedio ±SEM de 8 experimentos independientes realizados en triplicados en los ensayos de funcionalidad. Pruebas no paramétricas Mann-Whitney se usaron en el estudio de acumulación de AMPc (versus FK, *p<0.01)(D) o (versus Basal, *p<0.01) (E) o (versus PSB777 100 nM, #<0.01). Y, para la fosforilación de MAPK (versus basal,*p<0.01) o (versus CPA 100 nM, #<0.01) o (versus PSB777 100 nM, \$<0.01).

4.2.2. La expresión de A₁R, A_{2A}R y el complejo A₁R-A_{2A}R disminuye bajo el tratamiento con adenosina

Una vez observada la interacción específica entre los receptores A₁ y A_{2A} en células CHO transfectadas, decidimos determinar mediante el uso del kit Naveni™TriFlex Cell no tan solo la heteromerización in situ de los receptores (verde), sino también las cantidades totales relativas tanto del A₁R (magenta) como del A_{2A}R (amarillo) en células C6. Se utilizó la línea celular C6, de glioblastoma de rata, ya que expresa los receptores A₁ y A_{2A} de forma endógena (Figura 27A,B,D). Se realizó un ensayo de ligación por proximidad en células C6 no transfectadas en presencia de diferentes tratamientos con adenosina (ADO), agonista endógeno no selectivo de los receptores A₁R y A_{2A}R. En las células tratadas con una mayor concentración de adenosina (ADO 10 µM) se observa una disminución tanto del marcaje verde como de los marcajes magenta y amarillo (Figura 19A), correspondiendo con una disminución de la formación del heterómero, así como de los receptores A₁ y A_{2A}, respectivamente (Figura 27C). Sugiriendo que la estimulación con adenosina promueve la internalización de los receptores A₁ y A_{2A} presentes en membrana, así como, del heterómero A₁R-A_{2A}R. También se realizó este mismo ensayo en células C6 tratadas con cafeína (CAFFE), antagonista no selectivo del A₁R y el A_{2A}R. En el caso de las células tratadas con elevadas concentraciones de cafeína (10 µM y 100 µM), se observó un aumento significativo de los marcajes magenta y amarillo, correspondiendo a los niveles totales relativos de ambos receptores A₁ y A_{2A} respecto a las células tratadas con vehículo (Figura 27D). De manera interesante, este aumento no se detectó en la formación del heterómero A₁R-A_{2A}R (marcaje verde) (Figura 27A,E). Resultados congruentes con la retención de los receptores de adenosina a nivel de membrana plasmática ante el bloqueo de dichos receptores descrita con anterioridad (Cristóvão-Ferreira et al., 2013).

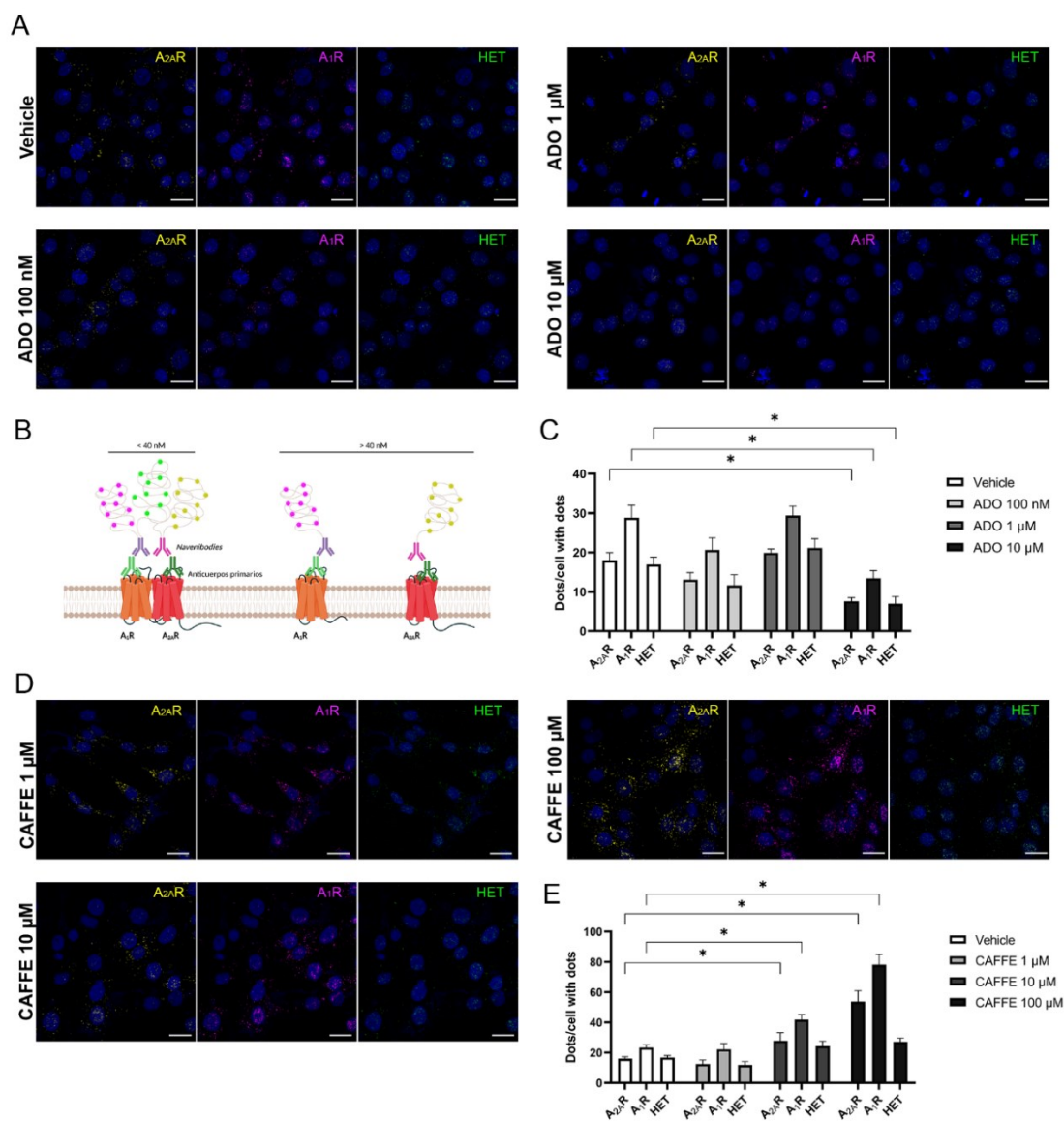


Figura 27. Expresión de A₁R, A_{2A}R y el heterómero A₁R-A_{2A}R en células C6. **A,D** Las cantidades totales de A₁R (magenta), A_{2A}R (amarillo) y la formación del heterómero A₁R-A_{2A}R (verde) se detectaron mediante ensayos de ligación por proximidad con el kit Naveni™TriFlex Cell (Navinci) en células C6. Se utilizaron anticuerpos primarios específicos de conejo contra A₁R y de ratón contra A_{2A}R. Cuando se indica, las células fueron tratadas durante 48 horas con concentraciones crecientes de adenosina (100 nM, 1 µM o 10 µM); o con concentraciones crecientes del antagonista no selectivo cafeína (1 µM, 10 µM o 100 µM). Se tomaron como control células tratadas con vehículo. Los núcleos celulares fueron marcados con Hoechst (azul). Escala: 20µm. **C** Cuantificación de los puntos amarillos por célula con puntos (correspondientes a la expresión de A_{2A}R), puntos magenta por célula con puntos (correspondientes a la expresión de A₁R) y puntos verdes por célula con puntos (correspondientes a la expresión del heterómero A₁R-A_{2A}R) en células C6. El análisis se condujo mediante el uso del software Duolink imageTool. Los datos se representan como promedio ±SEM (n=8). Se realizaron pruebas 2way ANOVA (versus el tratamiento con vehículo, *p<0.05). **B** Diagrama del ensayo con Naveni™TriFlex Cell (Navinci).

4.2.3. La expresión del complejo A₁R-A_{2A}R aumenta en astrocitos activados

Tras el análisis del complejo heteromérico A₁R-A_{2A}R en células CHO transfectadas y células C6, se procedió a determinar, por primera vez, mediante ensayos de PLA, la formación del

complejo en cultivos primarios de astrocitos de rata. El ensayo se realizó en células en reposo y en células activadas mediante un tratamiento con LPS (0.1% (v/v)). Como se observa en la Figura 28A, en los astrocitos en reposo se detecta la formación del heterómero $A_1R-A_{2A}R$ (unos 2 puntos rojos por célula) con un aumento significativo de puntos por célula respecto al control negativo (apenas 1 punto rojo por célula), donde el experimento de PLA se realizó en ausencia del anticuerpo primario específico contra- $A_{2A}R$ (Figura 28A). Además, en los cultivos primarios de astrocitos activados con LPS se observó un aumento significativo de puntos rojos sobre los núcleos marcados con Hoechst (cerca de 4 puntos rojos por célula)) respecto a los astrocitos en reposo (unos 2 puntos rojos por célula). Sugiriendo un potencial rol del heterómero $A_1R-A_{2A}R$ en procesos de activación astrogial.

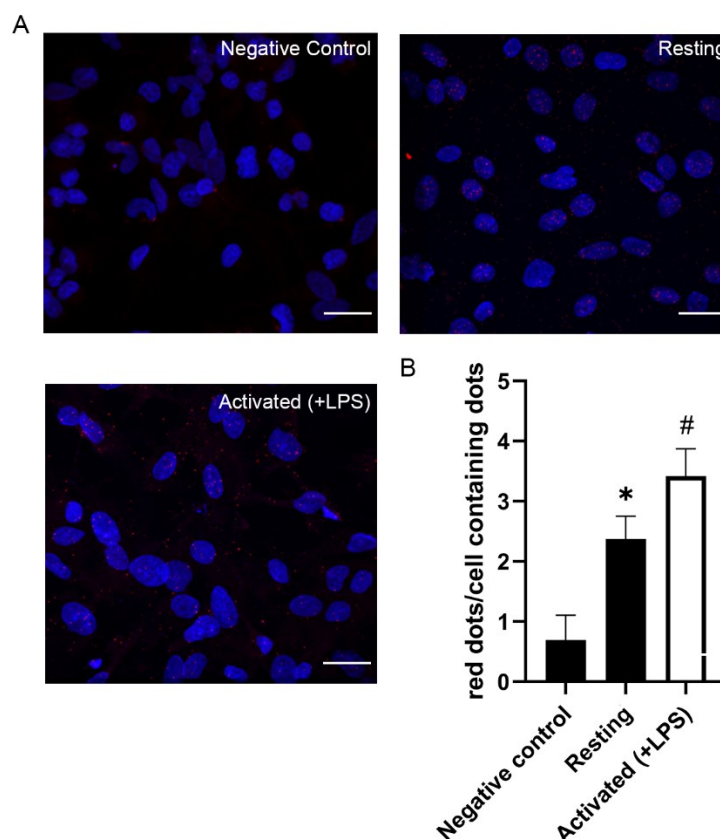


Figura 28. Expresión del heterómero $A_1R-A_{2A}R$ en cultivos primarios de astrocitos de rata. A Ensayo de PLA para detectar la formación del heterómero $A_1R-A_{2A}R$ usando anticuerpos primarios específicos de conejo contra A_1R y de ratón contra $A_{2A}R$. El control negativo se realizó en ausencia del anticuerpo primario específico contra- $A_{2A}R$. Los núcleos fueron marcados con Hoechst (azul). Escala: 50 μ m. B Cuantificación de los puntos rojos por células con puntos para determinar la expresión diferencial del complejo $A_1R-A_{2A}R$ en cultivos primarios de astrocitos en reposo o activados con LPS (0.1% (v/v)). El análisis se condujo mediante el uso del software Duolink ImageTool. Los datos se representan como promedio $\pm$ SEM (n=10). Pruebas no paramétricas Mann-Whitney se computaron para los valores de PLA (versus control negativo, *p<0.05).

4.2.4. El tratamiento con el agonista de A_1R aumenta la inmunoreactividad de GFAP en astrocitos activados

Con el objetivo de profundizar en el análisis de la implicación de los receptores A_1 y A_{2A} en la activación de los astrocitos, procedimos a realizar ensayos de inmunocitoquímica en

presencia de los agonistas específicos de los receptores A_1 y A_{2A} . Estos ensayos se basaron en el estudio de la detección de la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP), ampliamente usada como marcador de la activación de astrocitos tras un agravio al sistema nervioso central. La detección de GFAP se realizó en cultivos primarios de astrocitos en reposo y activados mediante el tratamiento con LPS (0.1% (v/v)) durante 48 horas previas al experimento.

Como era de esperar, se detectó una mayor señal de GFAP en los astrocitos activados (con LPS 0.1%(v/v)) en comparación con las células tratadas en reposo. Al tratar los cultivos primarios de astrocitos, en reposo o activados, con los agonistas selectivos de A_1R , CPA o de $A_{2A}R$ PSB777 o vehículo, se detectó un aumento significativo de la señal de GFAP ante el tratamiento con el agonista de A_1R , CPA. Resultado que sugiere una relación estrecha entre la activación de la astroglía y la funcionalidad del A_1R . Este efecto no se observó ante el tratamiento con PSB777, agonista específico de $A_{2A}R$ o en las células tratadas con vehículo.

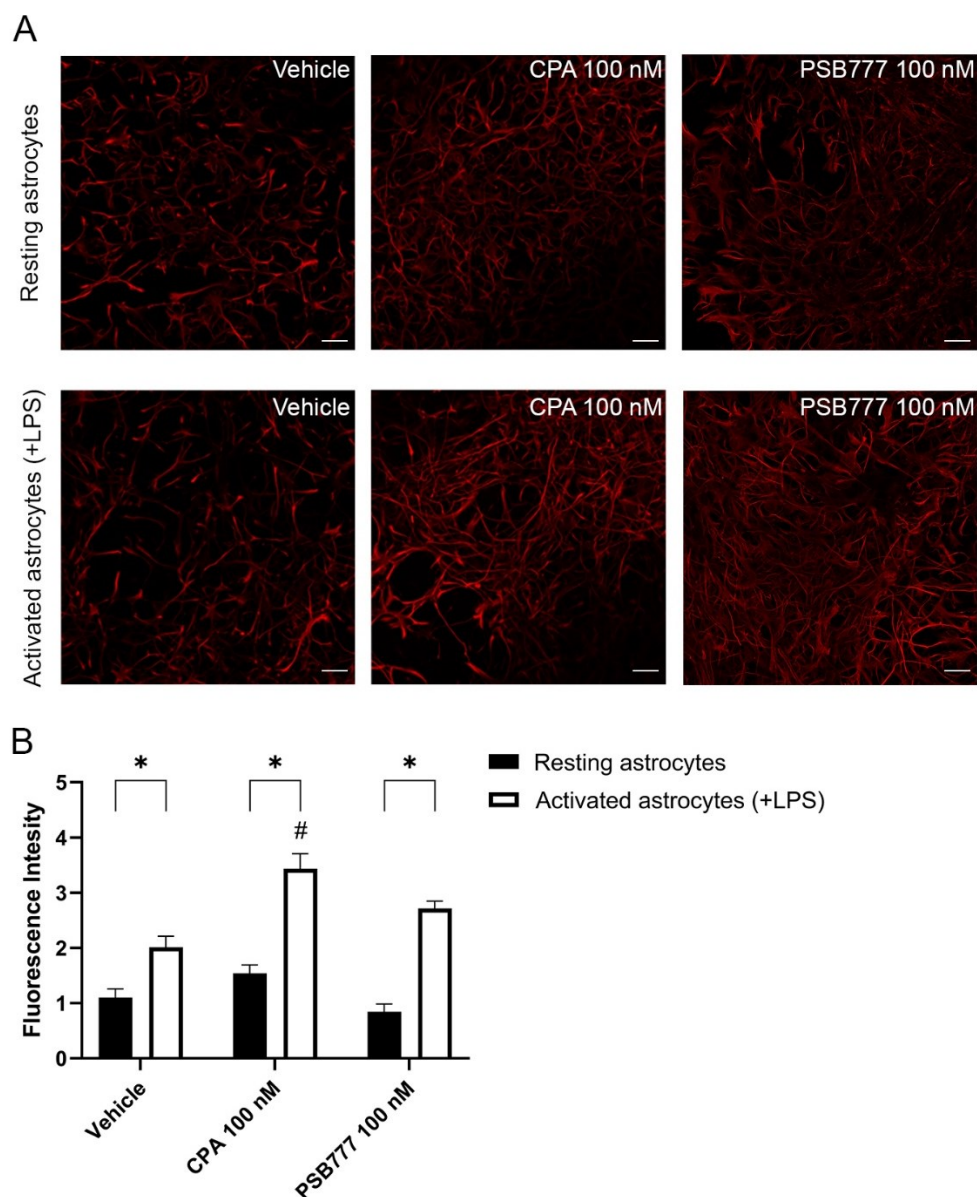


Figura 29. Determinación de la inmunoreactividad de GFAP en cultivos primarios de astrocitos. **A** Inmunocitoquímica para detectar la GFAP mediante el uso de un anticuerpo primario de cabra específico contra GFAP y un anticuerpo secundario contra cabra conjugado a Cy3 (en rojo).

Los cultivos primarios de astrocitos en reposo o activados con LPS (0.1%(v/v)) fueron tratados con los agonistas selectivos de A₁R y A_{2A}R, CPA (100 nM) y PSB777 (100 nM), respectivamente (24 horas antes del experimento). **B** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia detectada normalizada por el número de células presentes en el campo analizado. Los datos se representan como promedio $\pm$ SEM (n=10). Se llevaron a cabo pruebas estadísticas two-way ANOVA, seguidas de un test de Bonferroni, comparando dentro de cada grupo de tratamiento los valores del subgrupo de astrocitos activados (LPS 0.1% (v/v)) contra el subgrupo en reposo ($p^* < 0.05$). Y, comparando dentro del subgrupo de astrocitos activados (LPS 0.1% (v/v)) los distintos tratamientos ($p\# < 0.05$).

4.2.5. Caracterización de la funcionalidad del heterómero A₁R-A_{2A}R en cultivos primarios de astrocitos

Para un análisis más profundo de la implicación del heterómero A₁R-A_{2A}R en astrocitos, se procedió a evaluar la señalización mediada por el complejo heteromérico A₁R-A_{2A}R en cultivos primarios de astrocitos de rata en reposo y activados (con LPS 0,1% (v/v)). Dado que el receptor A₁ se acopla a proteína G_i, la determinación de la acumulación de AMPc se realizó en células estimuladas con Forskolina. Así, el receptor A_{2A} que se acopla a proteína G_s, el AMPc fue analizado en células estimuladas únicamente con los agonistas y antagonistas selectivos. En cultivos primarios de astrocitos tanto en reposo como activados (con LPS 0.1% (v/v) por 48 horas) se observó que la activación de A₁R por su agonista selectivo disminuía los niveles de AMPc intracelulares (Figura 22A,C). Del mismo modo que la activación de A_{2A}R con su agonista selectivo, PSB777, aumentaba los niveles de AMPc (Figura 30B,D). El tratamiento con ambos agonistas selectivos no afectó a la señalización de A_{2A}R. Fenómeno que se detectó tanto en astrocitos en reposo como en astrocitos activados (Figura 30B,D). Curiosamente, en el caso de los astrocitos en reposo, se observó que el pretratamiento con el antagonista selectivo de A₁R incrementaba la señal mediada por la activación de A_{2A}R.

En el caso de la vía de fosforilación de MAPK, la activación con ambos agonistas selectivos, CPA para A₁R y PSB777 para A_{2A}R presentó un efecto no aditivo en astrocitos en reposo. Además, la activación del receptor A₁ se vio bloqueada por su antagonista selectivo, DPCPX, pero también por el antagonista selectivo de A_{2A}R, SCH58621, definiendo un fenómeno de crossantagonismo. En el caso de los cultivos primarios de astrocitos activados (con LPS durante un período de 48 horas) se observó que el agonista selectivo de A_{2A}R no promovía la fosforilación de ERK1/2, señal que se recuperó en presencia del antagonista de A₁R, sugiriendo un bloqueo de A_{2A}R al encontrarse heteromerizando con A₁R. A la vez, la activación de A₁R fue bloqueada por su antagonista selectivo, DPCPX, pero también por el antagonista de A_{2A}R, indicando un fenómeno de crossantagonismo en cultivos de astrocitos activados.

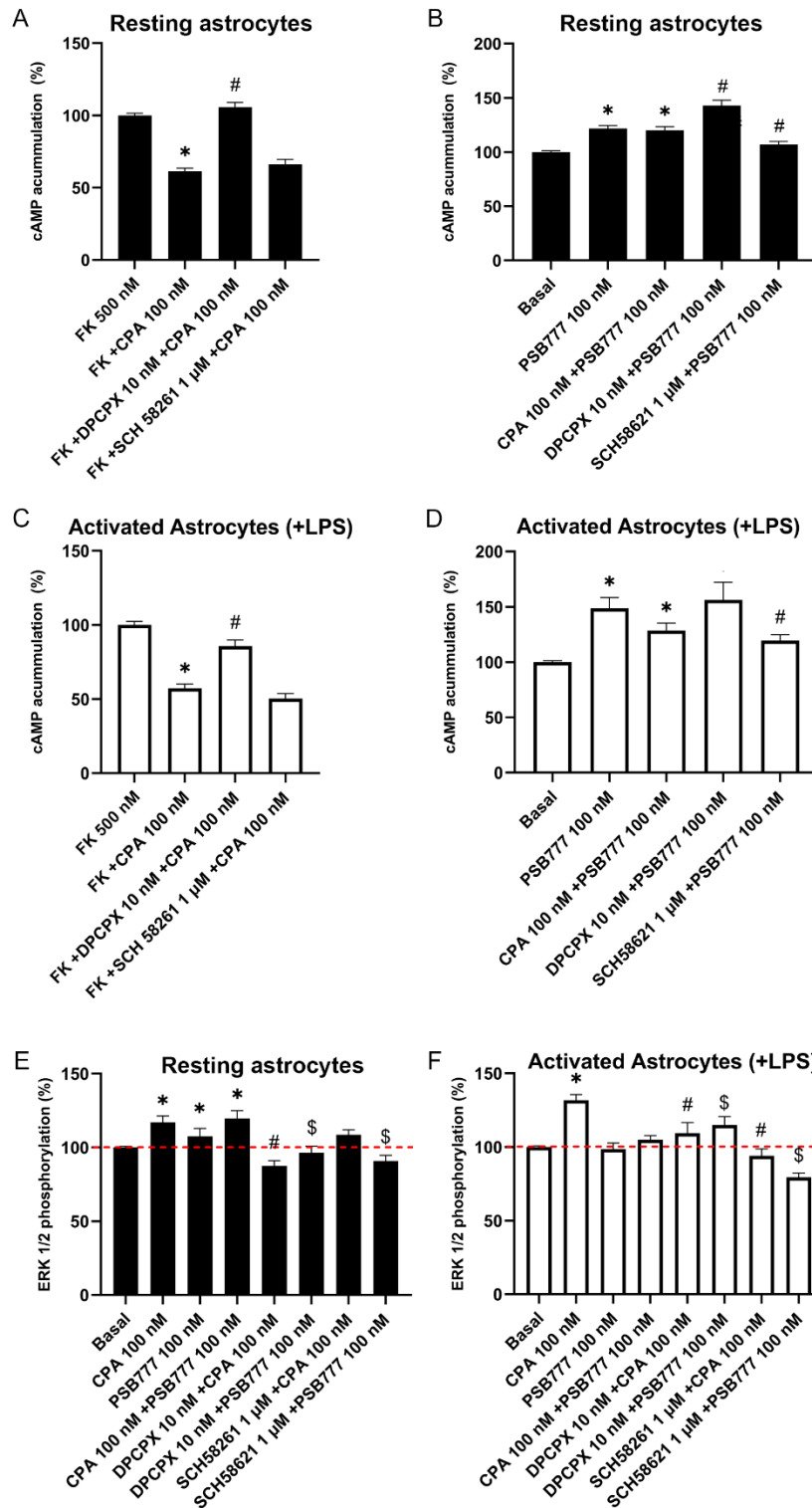


Figura 30. Señalización mediada por el complejo heteromérico A₁R-A_{2A}R en cultivos primarios de astrocitos. A-F Cultivos primarios de astrocitos de rata en reposo o tratados con LPS (0.1% (v/v)) durante un período de 48 horas, fueron pretratados con los antagonistas selectivos para A₁R o A_{2A}R, DPCPX (10 nM) o SCH58621 (1 μM), respectivamente, con la subsiguiente activación con los agonistas selectivos CPA (100 nM) y/o PSB777 (100 nM) de A₁R y A_{2A}R, respectivamente. A-D Para la determinación de los niveles de AMPc intracelulares, los cultivos primarios de astrocitos fueron estimulados con Forskolina (500 nM) o vehículo. Los datos se representan como promedio ±SEM de 6 a 8 experimentos independientes realizados en triplicados. Los datos se analizaron mediante pruebas estadísticas no paramétricas Mann-Whitney. En la acumulación de AMPc (versus basal,

* $p < 0.01$) o (versus CPA 100 nM, # $p < 0.01$) (**A,C**) o (PSB777 100 nM, # $p < 0.01$) (**B,D**). Y, en la fosforilación de MAPK (versus basal, * $p < 0.01$) o (versus CPA 100 nM, # $p < 0.01$) o (versus PSB777 100 nM, \$ $p < 0.01$).

4.2.6. La expresión del complejo A₁R-A_{2A}R aumenta en el área cortical de ratones tratados con cuprizona

Una vez caracterizada la funcionalidad del heterómero A₁R-A_{2A}R en astrocitos, nos planteamos determinar la expresión del heterómero en un modelo de ratón de esclerosis múltiple, donde la astrogliosis se encuentra activada. Este modelo consiste en ratones alimentados durante tres (C3) o seis (C6) semanas con pienso molido estándar conteniendo un 0.25% (p/p) de CPZ (bis(ciclohexanona)-oxaldihidrazona) o bien solo pienso estándar (U3) a modo de grupo vehículo. Se detectó, como se observa en la Figura 31, en secciones de los animales no tratados (U3) un 48.20% de células que presentaban puntos, con unos 3 puntos rojos por célula con puntos. Este resultado demuestra la expresión del complejo A₁R-A_{2A}R en secciones de ratón. Un aumento significativo del heterómero se detectó en los animales tratados con CPZ durante 3 semanas: un 63.38% de células presentaron puntos con alrededor de 4 puntos rojos por células con puntos. En los animales tratados durante seis semanas con CPZ (C6), el valor fue de 84.72% de células con puntos respecto al total de células con unos 7 puntos rojos por célula con puntos. Esta condición también presentaba un aumento significativo del complejo respecto a la condición U3 y la condición C3. El control negativo, realizado en ausencia del anticuerpo primario específico contra A₁R mostró, como se esperaba, un descenso de los puntos rojos por célula con puntos. Estos resultados apuntan al potencial del complejo A₁R-A_{2A}R como posible diana a considerar en el estudio de la esclerosis múltiple.

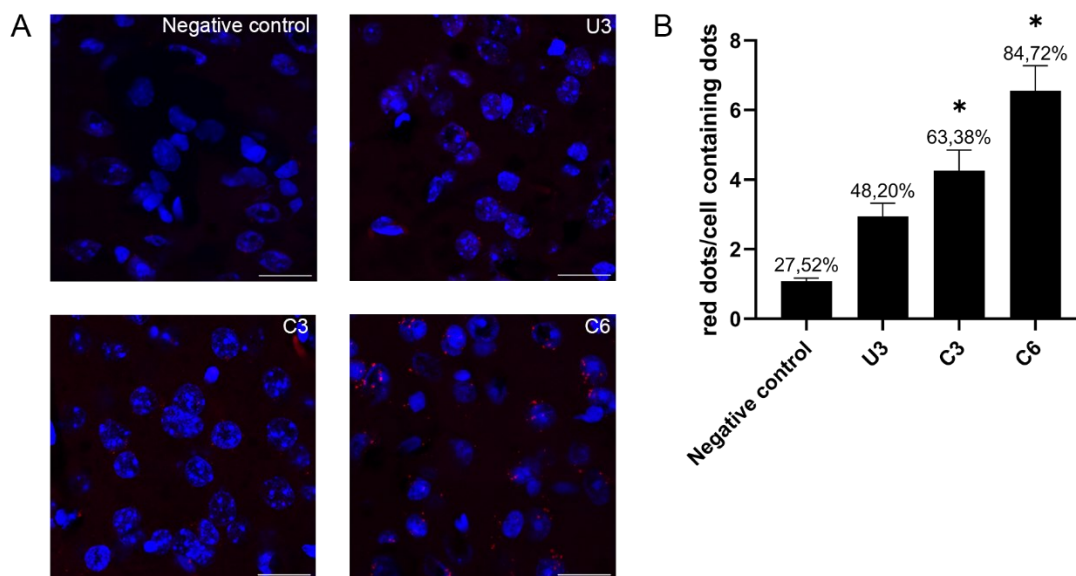


Figura 31. Expresión del complejo A₁R-A_{2A}R en secciones corticales de ratones modelo de EM. **A** La formación del complejo heteromérico A₁R-A_{2A}R en áreas corticales de cerebros de ratones no tratados (U3) o tratados con cuprizona (durante tres (C3) o seis (C6) semanas) se realizó mediante ensayos de ligación por proximidad (PLA). Se utilizaron anticuerpos primarios de conejo contra A₁R y de ratón contra A_{2A}R. En el control negativo no se añadió el anticuerpo específico contra A₁R. Los núcleos se marcaron con Hoechst (azul). Escala: 20 μ m. **B** La cuantificación para determinar la expresión diferencial del heterómero A₁R-A_{2A}R en áreas corticales de ratones U3, C3 y C6 se llevó a cabo usando el software Duolink ImageTool. Los porcentajes indican las células con puntos respecto

las células totales del campo analizado. Los datos se representan como promedio $\pm$ SEM (n=10). Se realizaron pruebas no paramétricas Mann-Whitney (versus U3) (*p<0.05).

4.3. Expresión del heterómero de los receptores de adenosina A_{2A}-A₃ en diferentes regiones cerebrales

4.3.1. Expresión diferencial del heterómero A_{2A}R-A₃R en cultivos primarios de neuronas de corteza, estriado e hipocampo

Teniendo en cuenta la expresión diferencial de los receptores de adenosina en las distintas regiones cerebrales, así como la previa descripción de una variación en dicha expresión en pacientes con EA, nos planteamos analizar la formación del complejo A_{2A}R-A₃R en diferentes áreas cerebrales. Con el objetivo de determinar si existe una expresión diferencial del heterómero se llevó a cabo la detección de la formación del complejo heteromérico A_{2A}R-A₃R mediante ensayos de ligación por proximidad (PLA) en cultivos primarios de neuronas de corteza frontal, estriado e hipocampo de ratón. Como se observa en la Figura 32, la expresión del complejo A_{2A}R-A₃R fue significativamente mayor en la región del estriado respecto a las regiones del hipocampo y la corteza frontal. Estos resultados correlacionan una mayor presencia del heterómero A_{2A}R-A₃R en regiones cerebrales con una mayor expresión del receptor A_{2A}.

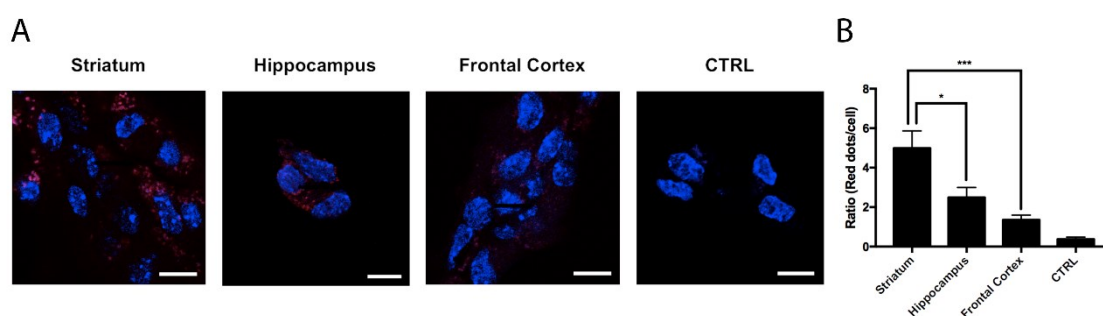


Figura 32. Expresión del heterómero A_{2A}R-A₃R en cultivos primarios de neuronas de fetos de ratones C57BL/6J hembra. **A** Detección de los heterómeros A_{2A}R-A₃R mediante ensayos de ligación por proximidad (PLA) en cultivos primarios de neuronas corticales, estriales e hipocampales aisladas de feto de ratón. Se usaron anticuerpos específicos de ratón contra el receptor A_{2A} y de conejo contra el receptor A₃. En el control negativo no se añadió el anticuerpo específico contra A₃R. Los núcleos fueron marcados con Hoechst (azul). Escala: 10 μ m **B** Cuantificación de los puntos rojos por célula. El análisis se realizó mediante el uso del *plug-in* Andy's algorithm del *software* Fiji. Pruebas t-test no pareadas se realizaron para la comparación del número de puntos rojos por célula de las diferentes regiones cerebrales (*p<0.05, ***p<0.001). Esta figura ha sido extraída del artículo (Lillo et al., 2022).

4.3.2. Caracterización de la funcionalidad del heterómero A_{2A}R-A₃R en cultivos primarios de neuronas corticales, estriales e hipocampales

Tras demostrar la expresión diferencial del heterómero A_{2A}R-A₃R entre neuronas del estriado, hipocampo y corteza frontal, se planteó analizar si las diferencias en expresión conllevarían diferencias a nivel funcional. Como se ha descrito con anterioridad, la formación del heterómero A_{2A}R-A₃R conlleva un bloqueo de la función dependiente de A₃R, el cual se ve invertido en presencia de antagonistas de A_{2A}R (Lillo et al, 2020). Dado que el receptor A_{2A} acopla proteína G_s y el receptor A₃ acopla proteína G_i, la determinación de los niveles de AMPc se realizó en condiciones con y sin estimulación con Forskolina. En cultivos primarios de neuronas de estriado, en las que se ha observado una mayor expresión del heterómero, el agonista de A_{2A}R, PSB777, incrementó los niveles de AMPc citosólico. Este

incremento fue bloqueado solo ante el pretratamiento con el antagonista selectivo de A_{2A}R, SCH58261. En estas mismas neuronas, el agonista del A₃R 2-Cl-IB-MECA redujo los niveles de AMPc inducidos por el tratamiento con PSB777 (Figura 33A). Ni en cultivos primarios de neuronas corticales ni hipocámpales, el tratamiento con agonistas supuso un incremento significativo en los niveles de AMPc (Figura 33B-C).

En cultivos primarios de neuronas corticales estimuladas con Forskolina 500 nM (FK), el agonista de A₃R, 2-CL-IB-MECA disminuyó los niveles de AMPc solo en presencia del antagonista selectivo de A_{2A}R (Figura 33D). Estos resultados son consistentes con los resultados obtenidos previamente en sistemas heterólogos de expresión (Lillo et al., 2020a), es decir, la activación de A₃R no conlleva el acoplamiento de G_i cuando éste se encuentra formando complejos heteroméricos con A_{2A}R. En el caso de las neuronas hipocámpales, el agonista de A₃R si fue capaz de disminuir los niveles de AMPc citosólico, debido, probablemente, a la proporción del A₃R que no forma heterómeros con el A_{2A}R. Aun así, el efecto del agonista de A₃R se vio incrementado ante el tratamiento con al antagonista de A_{2A}R (Figura 33E). Resultados similares se obtuvieron en neuronas de corteza frontal, aunque el descenso inducido por el 2-Cl-IB-MECA solo era significativo en presencia de SCH58621, el antagonista de A_{2A}R (Figura 33F).

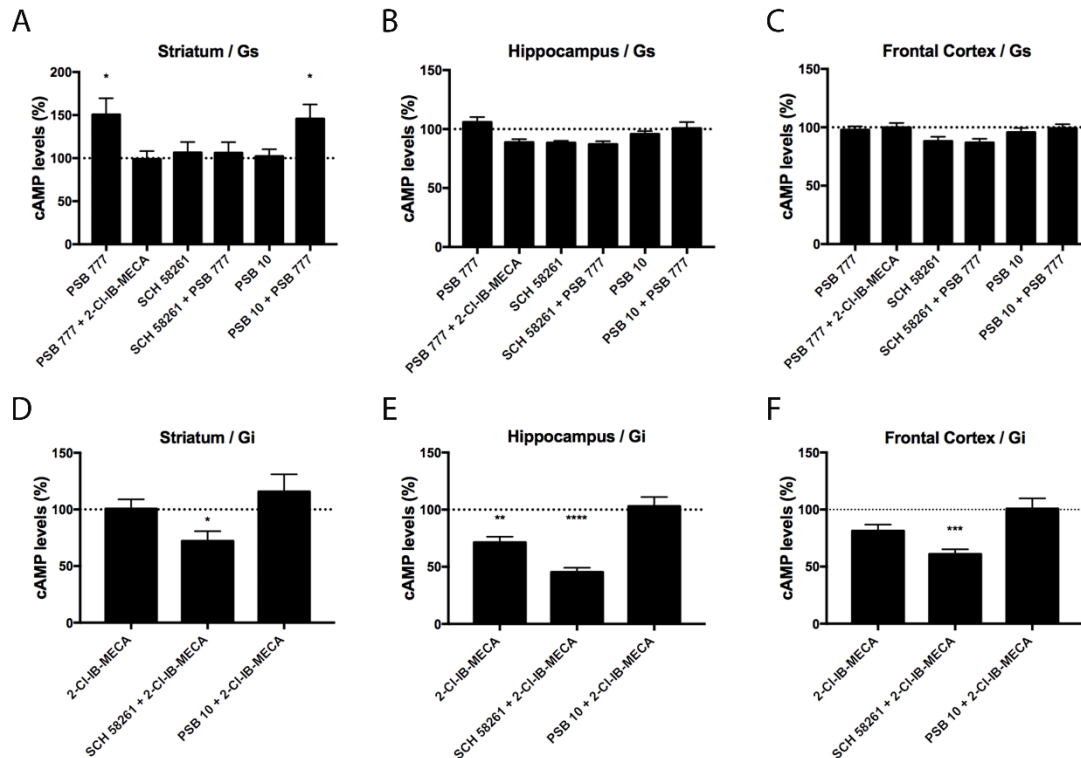


Figura 33. Señalización del heterómero A_{2A}R-A₃R en cultivos primarios de neuronas estriatales, hipocámpales y corticales de fetos de ratones C57BL/6J hembra. A-F Cultivos primarios de neuronas fueron pretratadas con los antagonistas selectivos SCH58621 (1 μ M) o PSB10 (1 μ M) para A_{2A}R y A₁R, respectivamente, con el subsiguiente tratamiento con los agonistas selectivos PSB777 (100 nM) y/o 2-Cl-IB-MECA (100 nM) para A_{2A}R y A₁R, respectivamente. Los niveles de AMPc se detectaron tras la estimulación con Forskolina (500 nM) o vehículo mediante el kit Lance Ultra AMPc (PerkinElmer). Los resultados han sido expresados en porcentaje respecto al basal (A-C) o respecto a la FK (D-F). Los datos se representan como promedio $\pm$ SEM de seis experimentos independientes realizados en triplicados. Pruebas One-way ANOVA seguidas de un test de Bonferroni fueron realizadas versus basal (A-C) o versus FK (D-F) (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, **** p <0.0001). Esta figura ha sido extraída del artículo (Lillo et al., 2022).

4.4. El complejo heteromérico NMDAR-CB₁R como posible diana terapéutica en la Enfermedad de Alzheimer

4.4.1. En el heterómero CB₁R-NMDAR, la activación de CB₁R bloquea la señalización dependiente de NMDAR en células HEK-293T transfectadas

Previamente a determinar la capacidad del receptor CB₁ para formar heterómeros con el receptor de NMDA, se analizó la expresión de ambos receptores en el mismo compartimento celular. Para ello, células HEK-293T fueron transfectadas con las proteínas de fusión CB₁R-YFP y NR1-Rluc junto a NR2B para la constitución del receptor NMDAR. La expresión de CB₁R se detectó mediante la fluorescencia propia de la proteína YFP (en verde) y la de NMDAR fue detectada mediante el uso de un anticuerpo primario de ratón contra Rluc y un anticuerpo secundario contra ratón conjugado a Cy3 (en rojo)(Figura 34A). La colocalización de ambos receptores a nivel de membrana plasmática se observa en amarillo (Figura 34A). Dado que la colocalización no implica una interacción física, se realizaron ensayos de transferencia de energía bioluminiscente (BRET). En estos, células HEK-293T fueron transfectadas con concentraciones constantes del ADNc correspondiente a NR1-Rluc y NR2B y concentraciones crecientes del ADNc CB₁R-YFP. Se obtuvo una curva de saturación de BRET que indica la interacción física entre ambos receptores y por lo tanto la formación de heterómeros CB₁R-NMDAR (Figura 34B). Como control negativo se repitió el mismo ensayo en células transfectadas con cantidades constante de D₁R-Rluc y cantidades crecientes de CB₁R-YFP (Figura 34B). Obteniendo una señal lineal que indica la falta de interacción entre dichos receptores.

Una vez demostrada la formación del complejo heteromérico CB₁R-NMDAR, nos planteamos analizar la funcionalidad de esta nueva unidad. Dado que CB₁R es un GPCR que acopla proteína G_i, descendiendo los niveles de AMPc intracelulares, en primer lugar, se analizó esta vía de señalización. La activación de células HEK-293T que expresaban CB₁R y NMDA con el agonista selectivo de CB₁R, ACEA; produjo el descenso esperado (aproximadamente de un 40%) de los niveles de AMPc tras la estimulación con Forskolina (Figura 34D). Como se esperaba, la estimulación con NMDA no produjo ningún efecto, dado que NMDAR no altera la señalización dependiente de esta vía. La coactivación con ambos agonistas, ACEA y NMDA, produjo una señal similar a la observada en el tratamiento independiente con ACEA. Curiosamente, la señal inducida por CB₁R se vio bloqueada no tan solo por su antagonista selectivo Rimonabant, sino también por el antagonista selectivo de NMDAR, MK-801. Este fenómeno se denomina crossantagonismo y podría ser útil para detectar la expresión del complejo CB₁R-NMDAR en tejido nativo.

Por otro lado, dado que la activación de NMDAR promueve la vía de las MAPK, se decidió analizar la fosforilación de ERK1/2 en células HEK-293T transfectadas con los ADNc para CB₁R y NMDAR. Se observó que la activación mediante los agonistas selectivos de ambos receptores dio lugar a una señal significativa (Figura 34E). En el caso del tratamiento conjunto con ambos agonistas, se observó un efecto no aditivo, es decir, inferior a la suma de los efectos inducidos por la activación de los receptores individualmente. De manera interesante, el efecto inducido por el NMDA fue bloqueado el tratamiento con MK-108, pero también con Rimonabant, y viceversa. Por lo que se observó un fenómeno de crossantagonismo bidireccional en la vía de las MAPK.

Puesto que NMDAR es un canal ionotrópico que induce la movilización del ion calcio tras su activación, se planteó el análisis de la acumulación de calcio en células HEK-293T que expresaban CB₁R y NMDAR tras la activación con sus ligandos selectivos. De manera interesante, la activación de CB₁R bloqueó parcialmente la señal inducida por NMDA (Figura

34E). Este efecto se denomina crosstalk negativo. De nuevo, se observó un fenómeno de crossantagonismo en esta vía de señalización. Como se esperaba, el agonista selectivo ACEA, como tratamiento independiente, no produjo ningún efecto.

La finalización de la señal mediada por los GPCR suele darse con la internalización del receptor mediante el reclutamiento de β -Arrestinas. Para determinar si la regulación negativa observada ejercida por CB₁R sobre NMDAR se debía a la internalización del complejo, se llevaron a cabo ensayos de reclutamiento de β -Arrestinas. Se observó que la activación del NMDAR potenciaba significativamente el reclutamiento de β -Arrestinas inducido por CB₁R. Lo cual demuestra que la actividad de NMDAR favorece la internalización de CB₁R, así como disminuye su señalización.

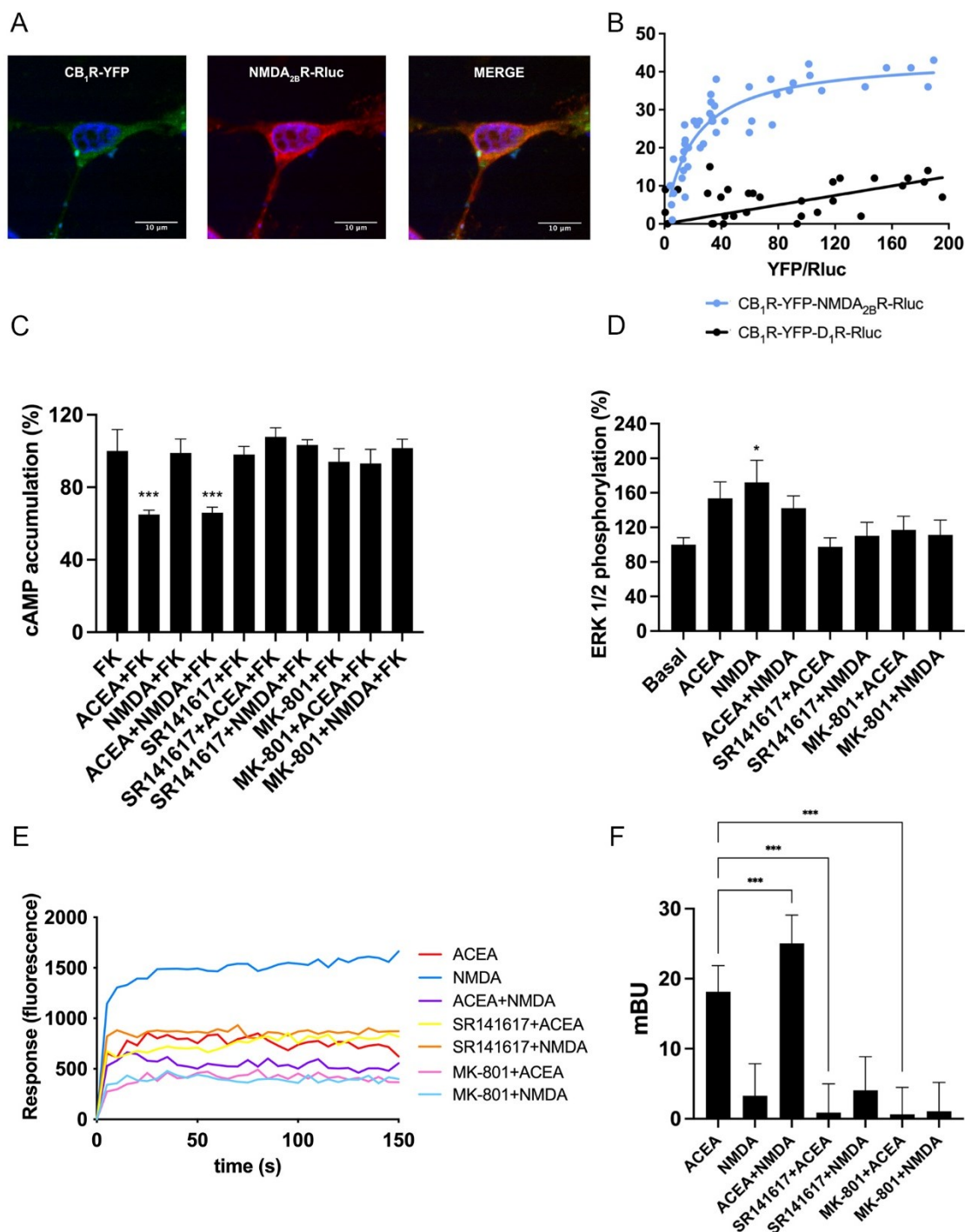


Figura 34. CB₁R y NMDAR forman complejos heteroméricos en células HEK-293T transfectadas. **A** Ensayo de inmunocitoquímica realizado en células HEK-293T transfectadas con CB₁R-YFP (0,5 µg de ADNc), el cual se detectó por la propia fluorescencia de la proteína YFP (en verde), NR2B (0,5 µg de ADNc) y NR1-Rluc (1 µg de ADNc), el cual se detectó mediante la incubación con un anticuerpo primario de ratón contra Rluc y un anticuerpo secundario contra ratón conjugado a Cy3 (en rojo). Los núcleos se marcaron con Hoechst (en azul). La colocalización se observa en amarillo. Escala: 10 µm. **B** Ensayos de BRET en células HEK-293T transfectadas con cantidades constantes de los ADNc correspondientes a NR1-Rluc (0,7 µg) y NR2B (0,3 µg) o D₁R-Rluc para el control negativo y cantidades crecientes del ADNc correspondiente a CB₁R-YFP (0,2-1 µg). **C,D** Células HEK-293T fueron transfectadas con los ADNc correspondientes a CB₁R (0,3 µg), NR1 (0,5 µg) y NR2B (0,5 µg) y pretratadas con los antagonistas selectivos (Rimonabant (o SR141617) para CB₁R o MK-801 para NMDAR). Con la consecuente activación mediante los agonistas selectivos (ACEA para CB₁R y/o NMDA para NMDAR). **C** las células HEK-293T fueron estimuladas con Forskolina (500 nM) para la determinación de los niveles de AMPc intracelulares. **E** La determinación de la liberación de calcio se realizó en células HEK-293T transfectadas con los ADNc correspondientes a CB₁R (0,3 µg), NR1 (0,5 µg), NR2B (0,5 µg) y al sensor de calcio GCaMP6 (0,5 µg), pretratadas con los antagonistas selectivos Rimonabant (o SR141617) para CB₁R o MK-801 para NMDAR, con la consiguiente activación con los agonistas selectivos. **F** El reclutamiento de β-arrestinas se evaluó en células HEK-293T que expresaban las proteínas CB₁R-YFP (1 µg de ADNc), NR1 (0,5 µg de ADNc) y NR2B (0,5 µg de ADNc) y β-Arrestina II-Rluc (0,5 µg de ADNc), pretratadas con los antagonistas selectivos, seguida de la activación con los agonistas selectivos. Los datos se representan como promedio ±SEM de seis experimentos independientes en triplicados en el caso de BRET y de seis a ocho experimentos independientes en triplicados en los ensayos de señalización. Se llevaron a cabo pruebas One-way ANOVA seguidas de un test de Bonferroni (*p<0.05,***p<0.001) versus FK en AMPc, versus la condición basal en la fosforilación de MAPK o versus la condición con ACEA en el reclutamiento de β-arrestinas.

4.4.2. La activación de NMDAR bloquea la señalización de CB₁R en cultivos primarios de neuronas de corteza

Para detectar la formación del complejo CB₁R-NMDAR, se desarrolló la técnica de PLA en cultivos primarios de neuronas corticales y se detectó la formación de clústeres rojos sobre núcleos marcados con Hoechst (Figura 35A). Se detectaron unos 2,5 puntos por célula con puntos, siendo >20% de neuronas las que presentaban puntos. Este resultado evidencia la expresión del complejo CB₁R-NMDAR en neuronas corticales de ratón. De manera interesante, el pretratamiento de las células con Aβ (500 nM) durante 48 horas indujo un incremento en el número de neuronas que expresaban puntos, así como en el número de puntos por célula (>40% de células presentaban puntos, con 4 puntos por célula con puntos). El control negativo se realizó en cultivos primarios no tratados con el anticuerpo contra CB₁R, con únicamente un 3% de células presentando puntos. Estos resultados demuestran la expresión del complejo CB₁R-NMDAR en neuronas corticales, con un incremento significativo tras el tratamiento con Aβ.

En los análisis de la vía de señalización del AMPc se observó que la activación con el agonista de CB₁R, ACEA, fue bloqueada por la activación de NMDAR. También se observó un fenómeno de crossantagonismo, ya que el antagonista selectivo de NMDAR, MK-801, bloqueaba la activación de CB₁R. En las células tratadas con Aβ (500 nM) durante 48 horas, se observó que la inhibición de CB₁R por la activación de NMDAR desaparecía. Resultado que podría ser explicado por el incremento en la expresión de CB₁R en el tratamiento con Aβ.

En el caso de la vía de las MAPK, se observó de nuevo que la activación de NMDAR bloqueaba la función de CB₁R. De la misma manera que la activación de CB₁R bloqueaba la de NMDAR.

También se detectó el fenómeno de crossantagonismo, en este caso bidireccional, ya que el antagonistas selectivo de CB₁R, Rimonabant (o SR141617) bloqueaba la señal de NMDAR. En el pretratamiento con A β (500 nM) durante 48 horas, la coactivación de ambos receptores mostró un efecto no aditivo en cultivos primarios de neuronas corticales.

De manera conjunta, estos resultados indican un bloqueo entre los receptores CB₁ y NMDA en neuronas corticales, que se ve alterado ante el tratamiento con A β .

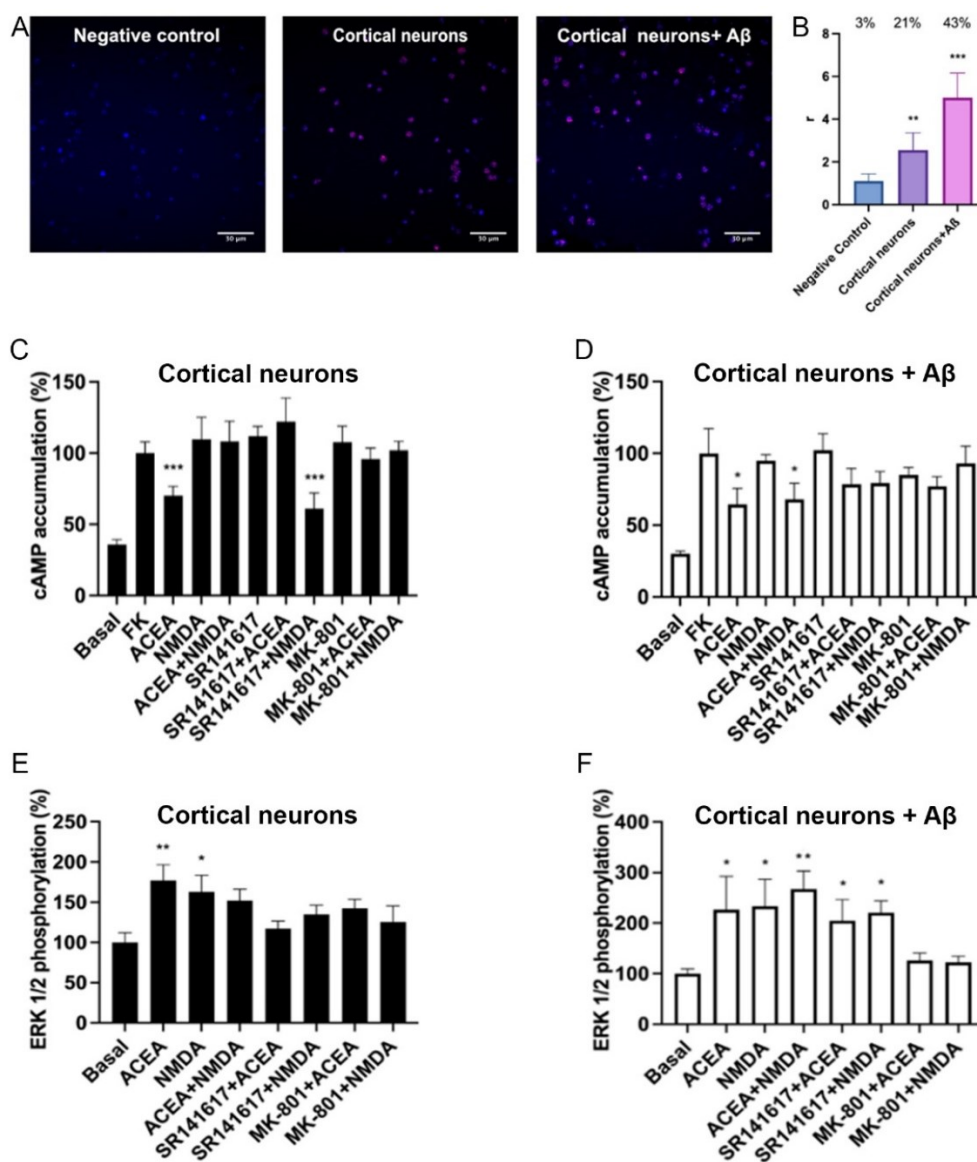


Figura 35. Funcionalidad del heterómero CB₁R-NMDAR en cultivos primarios de neuronas tratadas con A β . **A** Los ensayos de PLA se realizaron en cultivos primarios de neuronas corticales de ratones C57BL/6 tratados o no con el péptido A β (500 nM) durante 48 horas. El control negativo se realizó en ausencia del anticuerpo específico contra CB₁R. Los núcleos se marcaron con Hoechst (azul). Los heterómeros se observaron como puntos rojos en imágenes tomadas con el microscopio confocal (secciones superpuestas). Escala: 30 μ m. **B** Cuantificación del números de puntos rojos por célula (r). Los porcentajes representan el número de células que presentan puntos. Los datos se muestran como promedio $\pm$ SEM (n=6). Pruebas One-way ANOVA seguidas de un test de Bonferroni fueron llevadas a cabo (**<p0.01,***p<0.001 versus negative control). **C-F** Cultivos primarios de neuronas corticales de ratones C57BL/6 tratados (D,F) o no (C,E) con el péptido A β fueron estimuladas con los antagonistas selectivos (Rimonabant (o SR141617) para CB₁R o MK-801 para

NMDAR), y seguidamente activados con los agonistas selectivos ACEA, para CB₁R, y/ o NMDA, para NMDAR. **C,D** El análisis de la acumulación de AMPc se realizó tras la estimulación con Forskolina (500 nM). **E,F** La fosforilación de MAPK se realizó mediante el uso del kit AlphaScreen SureFire (PerkinElmer). Los datos se muestran como promedio $\pm$ SEM de 8 a 12 experimentos independientes realizados en triplicado. Pruebas One-way ANOVA seguidas de un test de Bonferroni se llevaron a cabo (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; versus la FK en los ensayos de AMPc o versus el tratamiento con vehículo en la fosforilación de MAPK).

A microscopic image of neurons, showing their cell bodies (soma) and branching processes (dendrites and axons) against a solid blue background. The neurons are dark, almost black, and their branching patterns are complex and interconnected.

RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas son aquellas que cursan con una pérdida de función y la muerte de las células nerviosas del sistema nervioso central (SNC) o periférico. El principal factor de riesgo para el desarrollo de gran parte de este tipo de enfermedades es la edad. Por lo que el aumento de la esperanza de vida global viene de la mano con el aumento de la prevalencia de las enfermedades neurodegenerativas (World Health Organization, 2020). La enfermedad de Alzheimer (EA) es la más prevalente actualmente, y al igual que el resto de las enfermedades neurodegenerativas, no tiene cura ni tratamientos efectivos en etapas tardías. Teniendo esto en cuenta, es crucial la detección temprana de este tipo de trastornos y el análisis de posibles nuevas dianas terapéuticas. Sumando los individuos en etapas tempranas de la EA y etapas más avanzadas, se estima que en 2023 hay unos 416 millones de individuos a nivel mundial afectados por la EA (Gustavsson et al., 2023). Las enfermedades que cursan con un proceso neurodegenerativo no se limitan a individuos de edad elevada. La esclerosis múltiple (EM), considerada un enfermedad de origen autoinmune, pero que también se engloba en la definición de enfermedad neurodegenerativa, se diagnostica en edades comprendidas entre los 20 y 40 años. La progresión de la EM se caracteriza por la aparición de relapsos, durante los cuales se da una activación exacerbada del sistema inmune que se asocia a un proceso neuroinflamatorio. Este proceso neuroinflamatorio agrava los síntomas de la EM y otras enfermedades neurodegenerativas promoviendo la muerte neuronal.

La adenosina, a nivel del sistema nervioso central, presenta funciones clave en la neuroinflamación, ya que modula la activación de los componentes celulares residentes principales del sistema inmune: microglía y astrogliá. La actividad de la adenosina en el SNC depende principalmente de su unión a los receptores de adenosina A_1 y A_{2A} , ambos GPCR de la clase A. La activación del receptor A_1 se asocia clásicamente con efectos inhibitorios, y se considera un agente neuroprotector. Mientras que, la activación del receptor A_{2A} se asocia a efectos proinflamatorios (Martí Navia et al., 2020).

El sistema endocannabinoide es otro sistema que desempeña un rol importante en la modulación de la respuesta ante una lesión en el SNC. La activación del receptor de cannabinoides CB_1 se conoce mundialmente por su efecto analgésico. El cual es resultado de la acción de CB_1R en múltiples vías, como por ejemplo es la inhibición de la liberación de GABA en la médula espinal (Bajic et al., 2018; Katona & Freund, 2008). Además, la activación de CB_1R presenta al igual que el A_1R , un rol neuroprotector en condiciones patológicas, siendo capaz de modular la respuesta inmune promoviendo la acción antiinflamatoria mediada por la microglía (Lou et al., 2018; Tanaka et al., 2020) generando un gran interés en el estudio de enfermedades neuropsiquiátricas.

Carriba demostró que el receptor CB_1 es capaz de formar complejos con el receptor de adenosina A_{2A} en células transfectadas y estriado de rata (Carriba et al., 2007a). Se ha descrito que los agonistas del CB_1R mediante su unión al heterómero $A_{2A}R$ - CB_1R presináptico son capaces de inhibir la liberación de glutamato. Más concretamente, la activación de CB_1R inhibe la acción constitutiva de $A_{2A}R$, que facilita la liberación tónica de glutamato, reduciendo el impacto excitotóxico de la acumulación de este neurotransmisor en el espacio extracelular (Ferré et al., 2023).

El estudio del sistema adenosinérgico y del sistema endocannabinoide se considera una diana terapéutica relevante en diversas enfermedades neurodegenerativas, dada la modulación sobre el proceso neuroinflamatorio que se les otorga (De Meij et al., 2021; Di Virgilio et al., 2020; Zoppi et al., 2011). Por un lado, la acción del receptor A_1 ha mostrado

efectos neuroprotectores en múltiples afectaciones neurodegenerativas. La administración del agonista selectivo de A₁R, CCPA, en el modelo animal de EM, EAE, muestra un efecto inmunosupresor en la astrogliá, que conduce a mitigar la progresión de la enfermedad (G. Liu et al., 2018). Del mismo modo, este agonista ejerce un efecto neuroprotector en un modelo de hipoxia crónica intermitente (Y. Zhang et al., 2020). De hecho, la sobreexpresión del receptor A₁ en neuronas limita la expansión de las lesiones en pacientes con encefalitis (Luan et al., 2017). Por lo que respecta al receptor A_{2A}, su bloqueo ha demostrado grandes efectos terapéuticos en enfermedades como la EP, un ejemplo es el comercializado principio activo istradefilina. En modelos de la EA, el efecto neuroprotector producido por el tratamiento con cafeína se asocia a su función antagónica sobre A_{2A}R (Faivre et al., 2018); así como se han observado efectos protectores en modelos de taupatías al eliminar genéticamente o bloquear mediante antagonistas selectivos el receptor A_{2A} (Laurent et al., 2016; Viana da Silva et al., 2016). Por otro lado, el receptor de cannabinoides CB₁ también destaca por su modulación de la neuroinflamación. Animales KO para la expresión de CB₁ en neuronas GABAérgicas han demostrado que la falta de CB₁R promueve la activación de microglía y astrocitos en ausencia de un estímulo nocivo, promoviendo un estado neuroinflamatorio (Ativie et al., 2018; Bilkei-Gorzo et al., 2018). Teniendo en cuenta la capacidad de oligomerizar de los receptores de adenosina y cannabinoides, y la relevancia de la actividad de dichos receptores en enfermedades que afectan al SNC, se planteó como uno de los objetivos de esta Tesis doctoral el estudio de la capacidad del receptor A₁ para formar complejos heteroméricos con el receptor de cannabinoides CB₁ y la señalización intracelular de esta nueva unidad funcional.

El estudio plasmado en el apartado 4.1 se inició valorando la posible formación del heterómero A₁R-CB₁R en un sistema heterólogo de expresión. La cual se demostró por primera vez mediante ensayos de transferencia de energía BRET. En células HEK-293T también se caracterizó la señalización del complejo A₁R-CB₁R. Se observó un crosstalk negativo en la vía de la acumulación de AMPc y en el reclutamiento de β -arrestinas. Así como un crossantagonismo bidireccional, en el que el tratamiento con el antagonista selectivo de A₁R, DPCPX, fue capaz de bloquear la activación de CB₁R, y el antagonista selectivo de CB₁R, Rimobabant, fue capaz de bloquear la activación de A₁R. En la vía de la fosforilación de MAPK, se observó un efecto no aditivo, donde la estimulación con ambos agonistas selectivos resultó en una señal igual a la señal obtenida ante la activación individual de A₁R. Manteniendo el fenómeno de crossantagonismo bidireccional. Representando una huella característica del heterómero para su identificación en tejido nativo.

A continuación, se demostró la formación del complejo A₁R-CB₁R en cultivos primarios de neuronas corticales de ratón mediante ensayos de PLA. Así mismo, se determinó la señalización del heterómero en estos cultivos de neuronas, observando un efecto no aditivo ante la coactivación de ambos receptores, tanto en la vía de acumulación de AMPc como en la de fosforilación de las MAPK. Igual que en el sistema heterólogo, se observó un fenómeno de crossantagonismo bidireccional. Finalmente, mediante ensayos de PLA se demostró la formación de heterómeros A₁R-CB₁R en cultivos primarios de astrocitos de rata, con un aumento significativo del número de complejos, y de células que expresaban complejos, en astrocitos activados mediante el tratamiento con LPS 0.1% (v/v) durante 48 horas. En cultivos primarios de astrocitos, al igual que en el sistema heterólogo, se observó un fenómeno de crosstalk negativo en la vía de acumulación de AMPc, y un efecto no aditivo en la fosforilación de las MAPK. Los resultados obtenidos en el heterómero A₁R-CB₁R muestran importantes diferencias a los descritos por el complejo A_{2A}R-CB₁R. En el caso del complejo A_{2A}R-CB₁R, se observa una dependencia de la actividad de CB₁R a la activación de A_{2A}R. Esta regulación funcional la asocian Carriba et al. al no acoplamiento por parte de CB₁R a la

proteína G_i en ausencia de la activación previa o simultánea de $A_{2A}R$ en el heterómero (Carriba et al., 2007b). En el caso del nuevo heterómero descrito A_1R - CB_1R , al estar frente a dos receptores que acoplan proteína G_i , el mecanismo de regulación podría ser distinto (Köfalvi et al., 2020; Sarasola et al., 2022), por lo que partiendo de estos resultados, análisis más extensos son necesarios.

Con el objetivo de aproximarnos al contexto fisiológico de la enfermedad de esclerosis múltiple, en la cual se han descrito la acción neuroprotectora de ambos receptores de interés: A_1R y CB_1R . Favoreciendo procesos tan relevantes en la EM como la remielinización y la autotolerancia, respectivamente (Arevalo-Martin et al., 2012; Cherchi et al., 2021), utilizamos un modelo de ratón tratado con cuprizona, validado como modelo de EM, que se caracteriza por presentar desmielinización y neuroinflamación. Mediante ensayos de PLA, se demostró la formación del complejo A_1R - CB_1R en secciones de corteza de animales tratados con cuprizona. Además, se observó un aumento en el número de heterómeros, y en el número de células que los expresan, en los animales tratados durante 6 semanas en comparación con los animales tratados durante 3 semanas o no tratados. Sugiriendo una relación entre la formación del complejo A_1R - CB_1R y la severidad de la enfermedad. Teniendo en cuenta que: (1) se ha descrito la disminución de los niveles de A_1R a nivel cerebral en pacientes de EM y modelos animales de EM (Johnston et al., 2001; Tsutsui et al., 2004), (2) el aumento de la formación del heterómero A_1R - CB_1R en condiciones más severas en el modelo de cuprizona, y (3) el bloqueo en la actividad de A_1R al formar heterómeros con CB_1R ; la formación del heterómero A_1R - CB_1R puede contribuir promoviendo la gravedad de la progresión de la EM en el modelo animal tratado con cuprizona.

Funcionalmente, por tanto, la formación de oligómeros se añade a los múltiples mecanismos que modulan los GPCR. Pudiendo afectar a su expresión en membrana, su acoplamiento a proteína G o la afinidad de los protómeros por sus ligandos (Navarro et al., 2016). Recientemente, en el ámbito de estudio de la interacción de los GPCR se ha propuesto el modelo GEMMA, de sus iniciales en inglés *GPCR-effector macromolecular membrane assembly*, el cual definen Ferré y et al. como un complejo de señalización preensamblado compuesto por una combinación particular de GPCR, proteínas G, efectores y otras proteínas asociadas a membrana que se localiza en la membrana plasmática (Ferré et al., 2022). Este concepto, por tanto, discute el modelo clásico basado en el ensamblaje inducido por ligando. Sugiriendo que el ligando es capaz de unirse de manera diferencial a GEMMA específicos, preensamblados y constituidos por una combinación concreta de GPCR y proteína G. En línea con este concepto, previamente, diferentes autores habían hipotetizado la importancia en condiciones fisiopatológicas de la estequiometría en la formación de oligómeros de GPCR (Borroto-Escuela & Fuxe, 2019; Ferré & Ciruela, 2019). Es decir, la proporción de un receptor que se encuentra en la membrana de manera independiente o formando homómeros o heterómeros. Por ejemplo, en el síndrome de las piernas inquietas, se ha descrito la disminución de la expresión de A_1R , que conlleva un aumento en la liberación de glutamato a nivel cortical y estriatal. Este efecto se sugiere es debido a la supuesta reducción de la formación del heterómero A_1R - $A_{2A}R$, que promueve la actividad de $A_{2A}R$ y por tanto se encontrará en membrana formando homómeros o heterómeros con otros receptores, como el CB_1R (Köfalvi et al., 2020).

Las técnicas más comunes para la determinación de la oligomerización de GPCR, presentan ciertas limitaciones a la hora de evaluar la estequiometría de los receptores. Muchas permiten la cuantificación de los complejos de interés, pero no indican la proporción del número de receptores o protómeros que forman parte de los complejos. En los últimos años,

se están desarrollando nuevas técnicas que nos permiten superar esta limitación (Navinci diagnostics, 2023; Raykova et al., 2022). Por lo que, nos hemos planteado como uno de los objetivos de esta Tesis doctoral el estudio de la técnica Naveni™TriFlex Cell en la formación del heterómero A₁R-A_{2A}R. Una nueva técnica de ligación por proximidad que permite la cuantificación de los receptores A₁R y A_{2A}R que forman o no parte del heterómero A₁R-A_{2A}R.

En primer lugar, se reevaluó la formación del heterómero A₁R-A_{2A}R en un modelo heterólogo de expresión. Se determinó, en células CHO transfectadas, la colocalización de los receptores A₁ y A_{2A} mediante inmunocitoquímica, así como la interacción específica de estos para formar el complejo A₁R-A_{2A}R mediante la técnica de BRET. En lo que respecta a la señalización dependiente del heterómero A₁R-A_{2A}R, en células CHO transfectadas, se evaluaron dos vías de señalización: la acumulación de AMPc intracelular y la fosforilación de MAPK. En la primera se observó un bloqueo de la activación de A₁R, la cual se recuperó en presencia del antagonista de A_{2A}R. Indicando un bloqueo del receptor A₁ cuando forma heterómeros con el receptor A_{2A}R. En la vía de la fosforilación de MAPK, se observó un efecto no aditivo ante la coactivación de ambos receptores y un fenómeno de crossantagonismo, en el cual el tratamiento con el antagonista de A₁R, DPCPX, fue capaz de bloquear la activación de A_{2A}R, y viceversa. Estos resultados sugieren una señalización sesgada por la vía dependiente de la acumulación de AMPc, en células CHO. Es decir, los agonistas utilizados presentan un sesgo favoreciendo la actividad de la vía dependiente de G_i, en detrimento de la dependiente de G_q.

A continuación, se evaluó mediante la técnica Naveni™TriFlex Cell (Navinci diagnostics, 2023) la proporción de los receptores A₁ y A_{2A} que se encontraban o no formando el heterómero A₁R-A_{2A}R en la línea celular C6. En un inicio se optimizó la técnica para el tipo de muestra utilizado. Se evaluaron, mediante tres marcadores fluorescentes: la expresión total de A₁R, la expresión total de A_{2A}R y la interacción de ambos formando el complejo A₁R-A_{2A}R. La cuantificación se realizó en las células C6 que expresan los receptores de manera endógena bajo tratamientos en concentraciones crecientes de adenosina, ligando endógeno y agonista inespecífico de A₁R y A_{2A}R, o bien de cafeína, antagonista inespecífico de A₁R y A_{2A}R. Por un lado, la concentración más elevada de adenosina (10 µM) provocó una disminución significativa de la expresión de los receptores A₁ y A_{2A}, así como de la formación del heterómero A₁R-A_{2A}R. Sugiriendo que la activación de los receptores por parte de la adenosina promueve la internalización de estos. Este resultado es coherente con el sistema de desensibilización homóloga, que se caracteriza por la internalización de los receptores inducida por la unión de un agonista (Klaasse et al., 2008). Teniendo en cuenta el incremento de la adenosina extracelular ante una lesión en el SNC (Pasquini et al., 2020), estos resultados aportan información sobre un posible proceso de compensación, para mitigar la acción exacerbada de los receptores de adenosina A₁ y A_{2A}, que son los que presentan una mayor afinidad por este ligando endógeno. Por otro lado, y de manera opuesta a lo observado en los tratamientos con adenosina, las células tratadas con cafeína presentaban una mayor expresión de los receptores A₁ y A_{2A}. En el caso de los tratamientos con cafeína a 10 µM y 100 µM, se observó un aumento significativo de la cantidad total de A₁R y A_{2A}R en comparación con el vehículo. De manera interesante, este aumento no afectó a la formación del heterómero A₁R-A_{2A}R, que se mantuvo igual entre los tratamientos. Resultados consecuentes con estudios previos que han descrito como la estimulación con agonistas selectivos de A₁R o A_{2A}R son capaces de promover la internalización del heterómero. Así mismo, se ha descrito que el bloqueo mediante antagonistas selectivos de A₁R o A_{2A}R es suficiente como para retener ambos receptores en membrana (Cristóvão-Ferreira et al., 2013). Estos datos junto a nuestros resultados resultan prometedores para el entendimiento de la formación del heterómero A₁R-A_{2A}R, sugiriendo que *in vitro* el aumento

de la expresión en membrana de los receptores A₁R y A_{2A}R no implica un aumento en la formación del heterómero A₁R-A_{2A}R.

La formación del complejo heteromérico A₁R-A_{2A}R se describió con anterioridad en cultivos primarios de astrocitos (Lanznaster et al., 2019; Moreno et al., 2018). Este complejo puede unir en astrocitos ambas proteínas G_s y G_i, mostrando funciones opuestas, regulando el transporte de GABA en astrocitos (Cristóvão-Ferreira et al., 2013). Teniendo en cuenta el papel relevante de los astrocitos en la fisiopatología de la EM, nos planteamos evaluar la formación y la funcionalidad del complejo A₁R-A_{2A}R en cultivos primarios de astrocitos y en cortes de animales modelo de EM. Así, se demostró por primera vez mediante la técnica de PLA la formación del complejo A₁R-A_{2A}R en cultivos primarios de astrocitos de rata. Observando un aumento significativo del número de complejos por célula en los astrocitos activados con LPS 0.1% (v/v) durante 48 horas. Indicando un aumento de la formación del complejo A₁R-A_{2A}R en condiciones lesivas, consistente con el aumento de la expresión de A_{2A}R tras una lesión cerebral en neuronas y glia (He et al., 2020). Para evaluar la implicación de la activación de los receptores A₁ y A_{2A} en la reactividad de la astrogliá, se determinó mediante inmunocitoquímica la expresión de la proteína GFAP, indicador clásico de activación astrogliá. En cultivos primarios de astrocitos de rata tratados con los agonistas selectivos de ambos receptores, CPA para A₁R y PSB777 para A_{2A}R, se observó en primer lugar y de manera esperada, un aumento significativo de la señal de GFAP en la astrogliá activada en comparación a las células en reposo. Por lo que respecta al tratamiento con los ligandos selectivos, observamos que el tratamiento con el agonista selectivo de A₁R, CPA, induce un aumento significativo de la señal de GFAP en astrocitos activados. Indicando que la activación del receptor A₁R en astrogliá promueve su estado activado. Otros autores han descrito con anterioridad este efecto mediado por el agonista selectivos de A₁R CCPA. La inyección de manera intraperitoneal e intracerebral del CCPA en ratas ha demostrado la capacidad de imitar los efectos de la activación de astrocitos (Y. Li et al., 2020).

La determinación de la acumulación de AMPc en cultivos primarios de astrocitos de rata en reposo mostró un efecto no aditivo ante la coestimulación con ambos agonistas selectivos. Curiosamente, el tratamiento con el antagonista de A₁R potenció el efecto de la activación de A_{2A}R, sugiriendo un bloqueo parcial de la actividad de A_{2A}R al formar heterómeros con A₁R en este tipo celular. Este efecto no se detectó en astrocitos activados, en los cuales se observó el efecto no aditivo ante la coactivación de ambos receptores. En el caso de la fosforilación de MAPK, se observó en astrocitos en reposo un efecto no aditivo ante la coestimulación con ambos agonistas selectivos de A₁R y A_{2A}R. Además, el pretratamiento con el antagonista selectivo de A₁R bloqueó la activación de A_{2A}R, indicando un fenómeno de crossantagonismo. Estos fenómenos también se observaron en astrocitos activados. De manera inesperada, en astrocitos activados el agonista de A_{2A}R, PSB777, no promovió la fosforilación de ERK1/2. Sería de esperar que, en astrocitos activados, en los que se ha descrito el aumento de expresión de A_{2A}R se observara una igual o mayor señal ante la activación mediada por PSB777. Este efecto se ha descrito previamente en líneas estables expresando el heterómero A₁R-A_{2A}R, donde la formación del complejo A₁R-A_{2A}R disminuye la eficiencia y la potencia del agonista selectivo de A_{2A}R: CGS21680, demostrando un mecanismo alostérico de tipo II (Ferré et al., 2022; Sarasola et al., 2022).

Con el objetivo de una aproximación fisiopatológica a la enfermedad de la EM, se utilizaron cortes de corteza de ratones del modelo de cuprizona. Estos animales fueron alimentados con cuprizona (0.25% p/p) o vehículo durante diversas semanas. La expresión en tejido de los complejos A₁R-A_{2A}R se determinó mediante ensayos de PLA. Los animales tratados con cuprizona durante 3 semanas (C3) o 6 semanas (C6) mostraron un incremento significativo

de la cantidad de heterómeros A₁R-A_{2A}R, así como del número de células que los expresan, en comparación con los animales vehículo (U3). Sugiriendo un rol relevante del heterómero formado por los receptores A₁ y A_{2A} en la progresión de la EM. El potencial terapéutico en la EM de los receptores A₁ y A_{2A} se ha investigado en diferentes estadios de desarrollo de la enfermedad. Y, en ambos casos se sugiere una ventana de acción limitada. En el caso del A₁R, su activación temprana presenta efectos neuroprotectores, limitando la respuesta inmune (Tsutsui et al., 2008a). Por otro lado, el bloqueo del receptor A_{2A}R presenta un efecto beneficioso, si se administra una vez iniciada la fase sintomática de la enfermedad (Loram et al., 2015). Por lo que la modulación del heterómero A₁R-A_{2A}R podría suponer un nuevo mecanismo de acción relevante en el tratamiento de la EM.

Teniendo en cuenta el potencial de la modulación del receptor A_{2A}, el estudio de este receptor como diana terapéutica se ha visto incrementado. Especialmente tras el éxito de la salida al mercado de la istradefilina, antagonista selectivo de A_{2A}R como tratamiento adyuvante para la enfermedad de Parkinson. Los antagonistas de A_{2A}R son también candidatos prometedores para combatir la enfermedad de Alzheimer y como compuestos seguros (Canas, Porciúncula, et al., 2009; S.-H. Choi et al., 2018; Gonçalves et al., 2019; Temido-Ferreira et al., 2020; Viana da Silva et al., 2016). De hecho, estudios realizados en modelos animales transgénicos han mostrado una acción neuroprotectora y/o una recuperación en el déficit cognitivo asociado al progreso de la EA. La investigación de la EA se ha centrado principalmente en neuronas, revelando dos aspectos característicos principales de la enfermedad de Alzheimer: depósitos extracelulares de la proteína amiloide y depósitos intracelulares de la proteína tau hiperfosforilada. Los antagonistas de A_{2A}R pueden ejercer un efecto neuroprotector previniendo el efecto nocivo del péptido beta-amiloide (Aβ), como se ha mostrado en neuronas y terminales nerviosos aislados (Canas et al., 2009; Dall'Igna et al., 2003). Aunque el papel del A₃R en el SNC ha recibido menos atención que otros receptores de adenosina, en 2002 Stones sugirió que la administración crónica de agonistas de A₃R puede proteger las neuronas contra el daño tisular. Por lo tanto, el bloqueo de A_{2A}R, o la activación de A₃R en neuronas parece ejercer un efecto neuroprotector en situaciones patológicas (Stone, 2002). La descripción del heterómero A_{2A}R-A₃R y del crosstalk negativo característico de su funcionalidad presenta una explicación del efecto protector de los antagonistas de A_{2A}R en neuronas que expresan el heterómero A_{2A}R-A₃R (Lillo et al., 2020; Lillo et al., 2022). De hecho, en el caso del complejo heteromérico, los antagonistas de A_{2A}R no tan solo bloquean la acción de este, además también promueven la activación de A₃R por la adenosina endógena, por lo que, agonistas exógenos de A₃R no serían necesarios para la promoción del efecto neuroprotector de A₃R. De esta manera, en esta Tesis se estableció como objetivo determinar la expresión del complejo heteromérico A_{2A}R-A₃R en cultivos primarios de neuronas estriatales, corticales e hipocámpales, así como la implicación a nivel de señalización.

Mediante ensayos de PLA se determinó la formación de complejos A_{2A}R-A₃R en cultivos primarios de neuronas de tres regiones cerebrales: estriado, hipocampo y corteza prefrontal. Se detectó un aumento significativo de la expresión de A_{2A}R-A₃R en el estriado, en comparación con las regiones hipocámpal y cortical. Estos resultados son congruentes con la expresión de A_{2A}R, la cual es mayor en estriado (M. Wang et al., 2022). Por lo que respecta a la señalización, se evaluó la vía de acumulación de AMPc ante la estimulación con Forskolina, para evaluar las reducciones inducidas por la acción de la proteína G_i que acopla A₃R; o respecto al valor basal, para evaluar los incrementos de AMPc, ante la acción de la proteína G_s que acopla A_{2A}R. Se observó, en cultivos primarios de neuronal estriatales, como

la activación de A₃R por su agonista selectivo tan solo mostraba señal en presencia del antagonista selectivo de A_{2A}R. Confirmando en esta región cerebral que el A₃R pierde su funcionalidad al formar heterómeros con A_{2A}R (Lillo et al., 2020b). Mostrando un alosterismo similar al descrito para el complejo A_{2A}R-CB₁R, basado en la acción antagonista entre G_s y G_i (Sarasola et al., 2022). En el caso de los cultivos primarios de neuronas de hipocampo y corteza frontal, el agonista específico de A₃R, 2-Cl-IBMECA, fue capaz de disminuir los niveles de AMPc, aunque solo resultó significativo en neuronas hipocámpales. Resultado consistente con la expresión y proporción de receptores A_{2A} que se encuentran formando heterómeros con el A₃R en estas regiones. Sin embargo, en ambas regiones, la señal inducida por la activación de A₃R fue promovida en presencia del antagonista selectivo de A_{2A}R, PSB10.

El fenómeno de excitotoxicidad es uno de los procesos más comunes en enfermedades neurodegenerativas, así como uno de los más relevantes para la progresión de éstas (Candelario-Jalil et al, 2022; Pluta et al., 2023). La excitotoxicidad causada por la acumulación de glutamato extracelular ha sido estudiada con profundidad en la EA (R. Wang & Reddy, 2017; Yu et al., 2023). Por ello, uno de los tratamientos actuales aprobados para el tratamiento de la EA es la memantina, antagonista no competitivo del receptor NMDA. La activación anormal de los NMDAR favorece este fenómeno de excitotoxicidad y con ello la muerte neuronal y el progreso de la enfermedad y sus síntomas cognitivos. El receptor NMDA es un canal iónico que pertenece a los receptores ionotrópicos de glutamato, siendo clave para la actividad excitatoria cerebral. La capacidad de este receptor para formar complejos con receptores GPCR ha sido descrita con anterioridad y ha cobrado gran interés en el estudio de enfermedades neuropsiquiátricas, ofreciendo nuevas dianas terapéuticas con el objetivo de paliar el proceso neurodegenerativo (Rafael Franco et al., 2020; Rivas-Santisteban et al., 2021). El rol neuroprotector que ejercen los receptores de cannabinoides y sus ligandos también ha sido estudiado en el contexto fisiopatológico de la EA. El agonista de CB₁R, ACEA, ha demostrado efectos antiinflamatorios en el modelo de APP/PS1, así como otros agonistas de CB₁R, y también de CB₂R, han demostrado ser efectivos agentes neuroprotectores promoviendo la eliminación de A β y previniendo el avance de déficits cognitivos asociados a la progresión de la EA (Cao et al., 2014; Khodadadi et al., 2021; Patricio-Martínez et al., 2019; Velikova et al., 2020). Así mismo, la activación de los receptores de cannabinoides CB₁R y CB₂R ha sido descrita como beneficiosa previniendo la acción tóxica derivada de la actividad anormal de los NMDAR (Liu et al., 2009; Molina-Holgado et al., 2003). De hecho, en estudios previos se ha demostrado en células transfectadas la interacción entre el receptor CB₁ y el receptor NMDA (Sánchez-Blázquez et al., 2013). Teniendo en cuenta estos precedentes, se determinó como último objetivo de esta Tesis doctoral la determinación de la formación de complejos CB₁R-NMDAR y su funcionalidad en modelos de expresión heteróloga y cultivos primarios de neuronas tratadas con el péptido β -amiloide (A β) para evaluar su posible implicación en la EA.

En primer lugar, se demostró la colocalización en membrana plasmática y la formación de complejos CB₁R-NMDAR en células HEK-293T transfectadas. Para el análisis funcional del complejo heteromérico, se evaluaron cuatro vías de señalización diferentes. En la acumulación de AMPc intracelular se observó un fenómeno de crossantagonismo, en el cual el antagonista de NMDAR, MK-801, fue capaz de bloquear la acción del agonista selectivo de CB₁R, ACEA. En la fosforilación de MAPK la coestimulación de ambos receptores mostró efectos no aditivos, siendo la señal de la activación de ambos igual a la del receptor CB₁R individualmente. También en esta vía se observó un crossantagonismo. Por lo que respecta

a la determinación de liberación de calcio, se observó un fenómeno de crosstalk negativo, donde la activación del receptor CB₁ bloqueó parcialmente la acción de NMDAR. Y de nuevo, un fenómeno de crossantagonismo ante el tratamiento con los antagonistas selectivos. Este bloqueo parcial que ejerce el receptor CB₁ sobre la señal medida por NMDAR, ha sido observado también en el complejo heteromérico formado por CB₂R y el receptor NMDA (Rivas-Santisteban et al., 2021). Por último, se evaluó el reclutamiento de β -arrestinas, con el objetivo de valorar si la modulación negativa que ejerce el CB₁R sobre el NMDAR depende de la internalización del complejo. Los resultados demostraron que la activación de NMDAR favorece el reclutamiento de β -arrestinas inducido por CB₁R. En esta vía, de nuevo, se observó un fenómeno de crossantagonismo, el cual podría facilitar la detección del heterómero CB₁R-NMDAR en contextos fisiológicos al ser una característica conservada de la formación del complejo. Estos resultados son consistentes con previos estudios que describen que el bloqueo de NMDAR, mediante el uso de antagonistas selectivos, reduce el efecto analgésico de agonistas de CB₁R e impide su correcta internalización (Sánchez-Blázquez et al., 2013).

Por tanto, nuestros resultados se suman a los estudios que demuestran una interacción directa entre el sistema cannabinoide y la regulación del receptor NMDA (Rivas-Santisteban et al., 2021). Resultando de gran interés en el estudio de posibles dianas terapéutica en enfermedades neurodegenerativas como la EA. Una de las principales características de la EA es la formación de agregados de proteína A β mal plegada. Los cuales se acumulan en el espacio extracelular, generando una respuesta inmune exacerbada e impidiendo el correcto funcionamiento de las sinapsis neuronales. Además, se ha descrito en múltiples estudios la capacidad de los oligómeros de A β para promover la desregulación de la homeostasis del Ca²⁺ citosólico promoviendo así la acción de NMDAR, el proceso de excitotoxicidad y la consecuente progresión de la EA (Arbel-Ornath et al., 2017; Cascella & Cecchi, 2021; Fani et al., 2021). En cultivos primarios de neuronas y en el modelo animal APP_{Sw} de la EA se ha descrito como la internalización de NMDAR ejerce un efecto neuroprotector ante la acción nociva de los oligómeros de A β (Bigi et al., 2023). La internalización del receptor NMDA depende de la acción de distintos adaptadores de clatrina. En terminales presinápticos, pero, al igual que los GPCR, destaca la función de la β -arrestina II para su desensibilización (G. Chen et al., 2016; Roche et al., 2001). Añadiendo un nuevo mecanismo de acción relevante para la modulación del receptor NMDA. Para determinar la posible implicación del heterómero CB₁R-NMDAR a nivel del sistema nervioso, y aproximarnos al contexto patológico de la EA, se utilizaron cultivos primarios de neuronas corticales de ratón tratadas con el péptido A β .

Mediante ensayos de PLA se demostró la formación del complejo CB₁R-NMDAR en cultivos primarios de neuronas corticales. Además, el tratamiento con A β durante 48 horas provocó un aumento significativo del número de heterómeros, así como de células que los expresan. Sugiriendo que el heterómero CB₁R-NMDAR presenta un rol relevante en la respuesta a la acción de los agregados A β propios de la EA. A nivel funcional se caracterizó la vía de acumulación de AMPc intracelular y la fosforilación de MAPK. En primer lugar, se observó, en la acumulación de AMPc, un bloqueo de la actividad de CB₁R al activar el NMDAR con su agonista selectivo, NMDA. Sin embargo, este efecto no se observó cuando los cultivos fueron tratados con A β . Además, en los cultivos tratados y no tratados con A β se detectó un fenómeno de crossantagonismo bidireccional. Estos resultados demuestran que el complejo CB₁R-NMDAR presenta una señalización diferencial ante el proceso fisiopatológico de la EA. Esta diferencia podría explicarse debido al aumento de la expresión de CB₁R. Consistente

con el aumento en la actividad de CB₁R observada en etapas tempranas del desarrollo de la EA (Manuel et al., 2014). Por lo que respecta a la fosforilación de MAPK, en cultivos primarios de neuronas corticales se observó un crosstalk negativo ante la estimulación de ambos receptores que se convirtió en un efecto no aditivo cuando las neuronas fueron tratadas con A β . También se detectó un fenómeno de crossantagonismo bidireccional en las células tratadas con A β y vehículo. Para una evaluación profunda del potencial del heterómero CB₁R-NMDAR como diana en el estudio de la EA, son necesarios experimentos en modelos animales de la enfermedad, valorando la expresión y señalización del complejo bajo el contexto patológico. Estos son unos resultados muy prometedores, que junto al conocimiento que ya se tiene sobre la acción de los receptores cannabinoides en la modulación del receptor NMDA, abren una nueva ventana al uso terapéutico de cannabinoides. El complejo CB₂R-NMDAR, por ejemplo, presenta un aumento de expresión en neuronas y microglía en animales modelo APP_{Sw/Ind}, representando un potencial mecanismo de modulación negativa del receptor NMDA en la EA (Rivas-Santisteban et al., 2021).

La formación de complejos heteroméricos ha desempeñado un papel crucial en el entendimiento integrado de diversos mecanismos observados *in vivo*, los cuales no podían ser explicados bajo el contexto de la acción individual de los GPCR, así como otros receptores, como en el caso del canal ionotrópico NMDAR. La regulación alostérica que implica la heteromerización otorga a estos complejos un gran potencial como dianas terapéuticas, especialmente en enfermedades que cursan con un proceso neurodegenerativo y que presentan neuroinflamación localizada o extendida. Dos ejemplos de estas enfermedades son la esclerosis múltiple y la enfermedad de Alzheimer, protagonistas de esta Tesis doctoral. Por tanto, los GPCR y su capacidad para interactuar entre sí o con otros receptores o proteínas, ofrece nuevas dianas terapéuticas en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Hecho demostrado por un vasto compendio de estudios e investigaciones, a los cuales se suman los resultados obtenidos en esta Tesis doctoral.

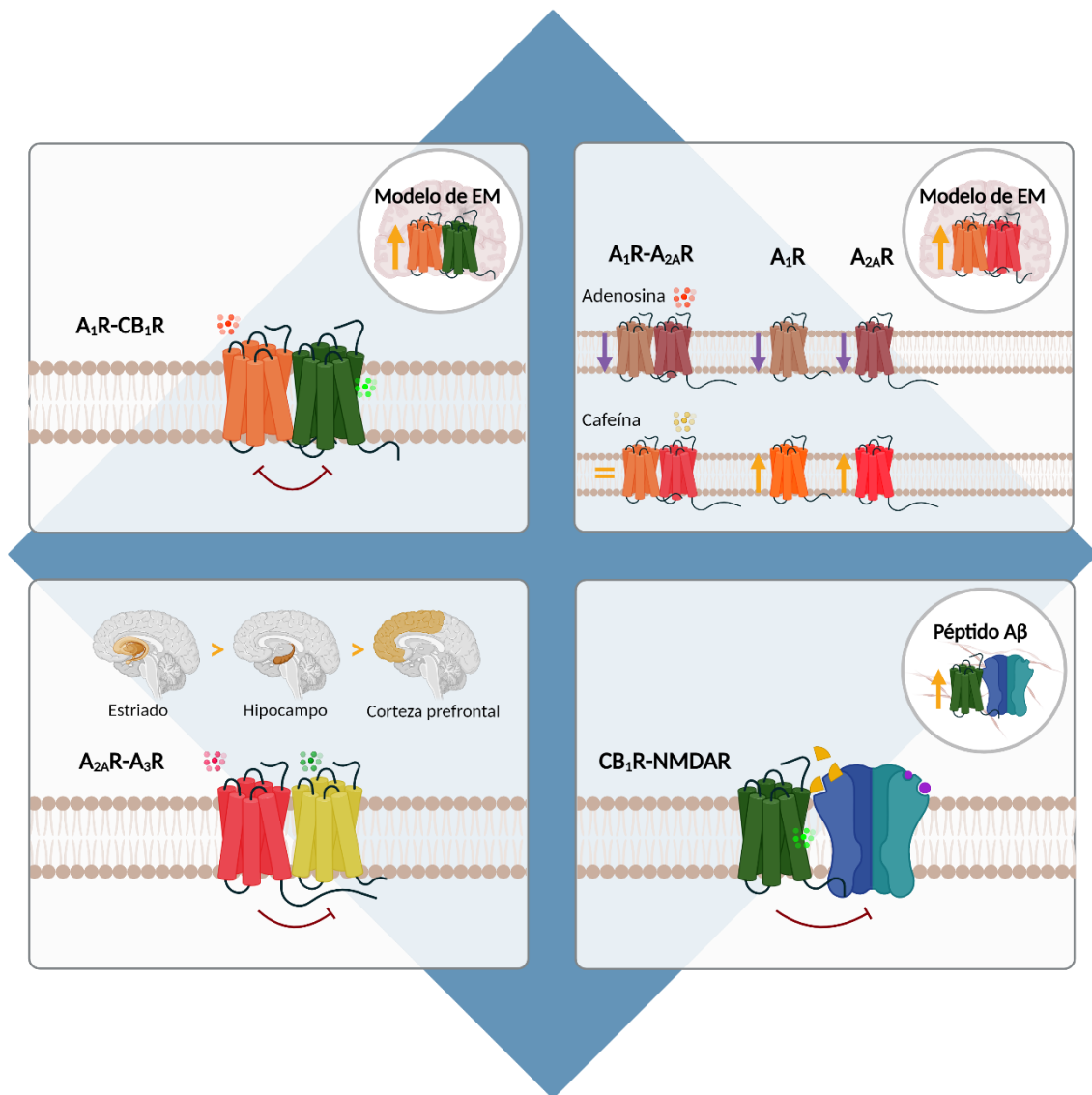


Figura 36. Resumen gráfico de resultados.

A microscopic image of neurons, showing their cell bodies (soma) and branching processes (dendrites and axons) against a solid blue background. The neurons are dark, almost black, and their branching patterns are complex and interconnected. One large neuron is prominent in the upper center, while another is visible in the lower right. The overall image has a scientific, clinical feel.

CONCLUSIONES

6.CONCLUSIONES

1. Los receptores A₁ y CB₁ forman complejos heteroméricos en células HEK-293T transfectadas, en cultivos primarios de neuronas corticales y de células de astrogliá.
2. En células HEK-293T transfectadas y en cultivos primarios de astrogliá la señalización mediada por A₁R-CB₁R presenta un crosstalk negativo y un fenómeno de crossantagonismo. En cultivos primarios de neuronas corticales el complejo A₁R-CB₁R muestra un efecto no aditivo y crossantagonismo.
3. La expresión del complejo A₁R-CB₁R incrementa en las zonas corticales de animales tratados con cuprizona.
4. La expresión en membrana de A₁R, de A_{2A}R y del heterómero A₁R-A_{2A}R disminuye tras tratar una línea celular de glioblastoma con adenosina. El tratamiento con cafeína incrementa la expresión en membrana de A₁R y de A_{2A}R sin afectar la del heterómero A₁R-A_{2A}R.
5. La expresión del heterómero A₁R-A_{2A}R aumenta en cultivos primarios de células astrogliales activadas en comparación con astrocitos en reposo y en áreas corticales de animales tratados con cuprizona.
6. La expresión del heterómero A_{2A}R-A₃R es mayor en cultivos primarios de neuronas del cuerpo estriado que en cultivos primarios de neuronas corticales o hipocampales.
7. En cultivos primarios de neuronas estriatales, hipocampales y corticales, la activación del A₃R se bloquea cuando se forman complejos con A_{2A}R; la señalización vía el receptor A₃ se recupera en presencia de un antagonista selectivo del receptor A_{2A}.
8. Los receptores CB₁ y NMDA forman heterómeros en células transfectadas y en cultivos primarios de neuronas corticales. En células transfectadas y cultivos primarios neuronales, la activación del CB₁R bloquea la función del NMDAR y se observa un fenómeno de crossantagonismo.
9. La expresión del complejo heteromérico CB₁R-NMDAR aumenta significativamente en neuronas corticales primarias tratadas con A β .



BIBLIOGRAFÍA

7.BIBLIOGRAFÍA

- Abood, M., Alexander, S. P. H., Barth, F., Bonner, T. I., Bradshaw, H., Cabral, G., ... Ross, R. A. (2019). Cannabinoid receptors (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. *IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE*, 2019(4). <https://doi.org/10.2218/gtopdb/F13/2019.4>
- Agnati, L. F., Franzen, O., Ferré, S., Leo, G., Franco, R., & Fuxe, K. (2003). *Possible role of intramembrane receptor-receptor interactions in memory and learning via formation of long-lived heteromeric complexes: focus on motor learning in the basal ganglia BT - Advances in Research on Neurodegeneration* (R. Horowski, Y. Mizuno, C. W. Olanow, W. H. Poewe, P. Riederer, J. A. Stoessl, & M. B. H. Youdim, Eds.). Vienna: Springer Vienna.
- Albasanz, J. L., Perez, S., Barrachina, M., Ferrer, I., & Martín, M. (2008). RESEARCH ARTICLE: Up-regulation of Adenosine Receptors in the Frontal Cortex in Alzheimer's Disease. *Brain Pathology*, 18(2), 211–219. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2007.00112.x>
- Albizu, L., Moreno, J. L., González-Maeso, J., & Sealfon, S. C. (2010). Heteromerization of G protein-coupled receptors: relevance to neurological disorders and neurotherapeutics. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, 9(5), 636–650. <https://doi.org/10.2174/187152710793361586>
- Alonso, A. D., Cohen, L. S., Corbo, C., Morozova, V., ElIdrissi, A., Phillips, G., & Kleiman, F. E. (2018). Hyperphosphorylation of Tau Associates With Changes in Its Function Beyond Microtubule Stability. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 338. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00338>
- Alzheimer's association. (2023). 2023 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia : The Journal of the Alzheimer's Association*, 19(4), 1598–1695. <https://doi.org/10.1002/alz.13016>
- Angulo, E., Casadó, V., Mallol, J., Canela, E. I., Viñals, F., Ferrer, I., ... Franco, R. (2003). A1 adenosine receptors accumulate in neurodegenerative structures in Alzheimer disease and mediate both amyloid precursor protein processing and tau phosphorylation and translocation. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 13(4), 440–451. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2003.tb00475.x>
- Arbel-Ornath, M., Hudry, E., Boivin, J. R., Hashimoto, T., Takeda, S., Kuchibhotla, K. V., ... Bacskai, B. J. (2017). Soluble oligomeric amyloid- β induces calcium dyshomeostasis that precedes synapse loss in the living mouse brain. *Molecular Neurodegeneration*, 12(1), 27. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0169-9>
- Arevalo-Martin, A., Molina-Holgado, E., & Guaza, C. (2012). A CB1/CB2 receptor agonist, WIN 55,212-2, exerts its therapeutic effect in a viral autoimmune model of multiple sclerosis by restoring self-tolerance to myelin. *Neuropharmacology*, 63(3), 385–393. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.04.012>
- Arosio, B., Casati, M., Gussago, C., Ferri, E., Abbate, C., Scortichini, V., ... Mari, D. (2016). Adenosine Type A 2A Receptor in Peripheral Cell from Patients with Alzheimer's Disease, Vascular Dementia, and Idiopathic Normal Pressure Hydrocephalus: A New/Old Potential Target. *Journal of Alzheimer's Disease*, 54, 417–425. <https://doi.org/10.3233/JAD-160324>
- Asai, H., Ikezu, S., Tsunoda, S., Medalla, M., Luebke, J., Haydar, T., ... Ikezu, T. (2015). Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nature Neuroscience*, 18(11), 1584–1593. <https://doi.org/10.1038/nn.4132>

- Ascherio, A., & Munger, K. L. (2014). Not too late to take vitamin D supplements. *Annals of Neurology*, 76(3), 321–322. <https://doi.org/10.1002/ana.24239>
- Asong, G., Zhu, X. Y., Bricker, B., Andey, T., Amisah, F., Lamango, N., & Ablordeppey, S. Y. (2019). Bioorganic & Medicinal Chemistry New analogs of SYA013 as sigma-2 ligands with anticancer activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 27(12), 2629–2636. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.04.012>
- Ativie, F., Komorowska, J. A., Beins, E., Albayram, Ö., Zimmer, T., Zimmer, A., ... Bilkei-Gorzo, A. (2018). Cannabinoid 1 Receptor Signaling on Hippocampal GABAergic Neurons Influences Microglial Activity. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 295. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00295>
- Bajic, D., Monory, K., Conrad, A., Maul, C., Schmid, R. M., Wotjak, C. T., & Stein-Thoeringer, C. K. (2018). Cannabinoid Receptor Type 1 in the Brain Regulates the Affective Component of Visceral Pain in Mice. *Neuroscience*, 384, 397–405. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.05.041>
- Banati, R. B., Newcombe, J., Gunn, R. N., Cagnin, A., Turkheimer, F., Heppner, F., ... Myers, R. (2000). The peripheral benzodiazepine binding site in the brain in multiple sclerosis: quantitative in vivo imaging of microglia as a measure of disease activity. *Brain : A Journal of Neurology*, 123 (Pt 1), 2321–2337. <https://doi.org/10.1093/brain/123.11.2321>
- Batalla, A., Janssen, H., Gangadin, S. S., & Bossong, M. G. (2019). The Potential of Cannabidiol as a Treatment for Psychosis and Addiction: Who Benefits Most? A Systematic Review. *Journal of Clinical Medicine*, 8(7). <https://doi.org/10.3390/jcm8071058>
- Bateman, R. J., Cummings, J., Schobel, S., Salloway, S., Vellas, B., Boada, M., ... Doody, R. S. (2022). Gantenerumab: an anti-amyloid monoclonal antibody with potential disease-modifying effects in early Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy*, 14(1), 178. <https://doi.org/10.1186/s13195-022-01110-8>
- Bátkai, S., Mukhopadhyay, P., Horváth, B., Rajesh, M., Gao, R. Y., Mahadevan, A., ... Pacher, P. (2012). Δ^8 -Tetrahydrocannabivarin prevents hepatic ischaemia/reperfusion injury by decreasing oxidative stress and inflammatory responses through cannabinoid CB2 receptors. *British Journal of Pharmacology*, 165(8), 2450–2461. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01410.x>
- Belkaid, Y., & Harrison, O. J. (2017). Homeostatic Immunity and the Microbiota. *Immunity*, 46(4), 562–576. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.04.008>
- Belov Kirdajova, D., Kriska, J., Tureckova, J., & Anderova, M. (2020). Ischemia-Triggered Glutamate Excitotoxicity From the Perspective of Glial Cells . *Frontiers in Cellular Neuroscience* , Vol. 14. Retrieved from <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2020.00051>
- Biegon, A., & Kerman, I. A. (2001). Autoradiographic Study of Pre- and Postnatal Distribution of Cannabinoid Receptors in Human Brain. *NeuroImage*, 14(6), 1463–1468. <https://doi.org/10.1006/nimg.2001.0939>
- Bigi, A., Cascella, R., Fani, G., Bernacchioni, C., Cencetti, F., Bruni, P., ... Cecchi, C. (2023). Sphingosine 1-phosphate attenuates neuronal dysfunction induced by amyloid- β oligomers through endocytic internalization of NMDA receptors. *The FEBS Journal*, 290(1), 112–133. <https://doi.org/10.1111/febs.16579>
- Bilkei-Gorzo, A., Albayram, O., Ativie, F., Chasan, S., Zimmer, T., Bach, K., & Zimmer, A.

- (2018). Cannabinoid 1 receptor signaling on GABAergic neurons influences astrocytes in the ageing brain. *PloS One*, 13(8), e0202566. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202566>
- Bjornevik, K., Cortese, M., Healy, B. C., Kuhle, J., Mina, M. J., Leng, Y., ... Ascherio, A. (2022). Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science*, 375(6578), 296–301. <https://doi.org/10.1126/science.abj8222>
- Blankman, J. L., Simon, G. M., & Cravatt, B. F. (2007). A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chemistry & Biology*, 14(12), 1347–1356. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2007.11.006>
- Bobermin, L. D., Roppa, R. H. A., & Quincozes-Santos, A. (2019). Adenosine receptors as a new target for resveratrol-mediated glioprotection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1865(3), 634–647. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.01.004>
- Boggs, D. L., Nguyen, J. D., Morgenson, D., Taffe, M. A., & Ranganathan, M. (2018). Clinical and Preclinical Evidence for Functional Interactions of Cannabidiol and $\Delta(9)$ -Tetrahydrocannabinol. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 43(1), 142–154. <https://doi.org/10.1038/npp.2017.209>
- Bolós, M., Perea, J. R., & Avila, J. (2017). Alzheimer's disease as an inflammatory disease. *Biomolecular Concepts*, 8(1), 37–43. <https://doi.org/10.1515/bmc-2016-0029>
- Bono, F., Mutti, V., Fiorentini, C., & Missale, C. (2020). Dopamine D3 Receptor Heteromerization: Implications for Neuroplasticity and Neuroprotection. *Biomolecules*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/biom10071016>
- Borea, P. A., Gessi, S., Merighi, S., Vincenzi, F., & Varani, K. (2018). Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art. *Physiological Reviews*, 98(3), 1591–1625. <https://doi.org/10.1152/physrev.00049.2017>
- Borroto-Escuela, D. O., & Fuxe, K. (2019). Adenosine heteroreceptor complexes in the basal ganglia are implicated in Parkinson's disease and its treatment. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 126(4), 455–471. <https://doi.org/10.1007/s00702-019-01969-2>
- Bozdemir, E., Vigil, F. A., Chun, S. H., Espinoza, L., Bugay, V., Khoury, S. M., ... Lechleiter, J. D. (2021). Neuroprotective Roles of the Adenosine A3 Receptor Agonist AST-004 in Mouse Model of Traumatic Brain Injury. *Neurotherapeutics*, 18(4), 2707–2721. <https://doi.org/10.1007/s13311-021-01113-7>
- Brennan, M. S., Matos, M. F., Richter, K. E., Li, B., & Scannevin, R. H. (2017). The NRF2 transcriptional target, OSGIN1, contributes to monomethyl fumarate-mediated cytoprotection in human astrocytes. *Scientific Reports*, 7, 42054. <https://doi.org/10.1038/srep42054>
- Brier, M. R., Gordon, B., Friedrichsen, K., McCarthy, J., Stern, A., Christensen, J., ... Ances, B. M. (2016). Tau and A β imaging, CSF measures, and cognition in Alzheimer's disease. *Science Translational Medicine*, 8(338), 338ra66. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf2362>
- Britschgi, M., Takeda-Uchimura, Y., Rockenstein, E., Johns, H., Masliah, E., & Wyss-Coray, T. (2012). Deficiency of terminal complement pathway inhibitor promotes neuronal tau pathology and degeneration in mice. *Journal of Neuroinflammation*, 9, 220.

<https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-220>

- Brosnan, C. F., & Raine, C. S. (2013). The astrocyte in multiple sclerosis revisited. *Glia*, 61(4), 453–465. <https://doi.org/10.1002/glia.22443>
- Broussas, M., Cornillet-Lefèvre, P., Potron, G., & Nguyen, P. (1999). Inhibition of fMLP-triggered respiratory burst of human monocytes by adenosine: involvement of A3 adenosine receptor. *Journal of Leukocyte Biology*, 66(3), 495–501.
- Burnstock, G. (2018). Purine and purinergic receptors. *Brain and Neuroscience Advances*, 2, 2398212818817494. <https://doi.org/10.1177/2398212818817494>
- Busquets-Garcia, A., Desprez, T., Metna-Laurent, M., Bellocchio, L., Marsicano, G., & Soria-Gomez, E. (2015). Dissecting the cannabinergic control of behavior: The where matters. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 37(11), 1215–1225. <https://doi.org/10.1002/bies.201500046>
- Cabello, N., Gandía, J., Bertarelli, D. C. G., Watanabe, M., Lluís, C., Franco, R., ... Ciruela, F. (2009). Metabotropic glutamate type 5, dopamine D2 and adenosine A2a receptors form higher-order oligomers in living cells. *Journal of Neurochemistry*, 109(5), 1497–1507. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06078.x>
- Callén, L., Moreno, E., Barroso-Chinea, P., Moreno-Delgado, D., Cortés, A., Mallol, J., ... McCormick, P. J. (2012). Cannabinoid Receptors CB₁ and CB₂ Form Functional Heteromers in Brain *. *Journal of Biological Chemistry*, 287(25), 20851–20865. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.335273>
- Canas, P. M., Duarte, J. M. N., Rodrigues, R. J., Köfalvi, A., & Cunha, R. A. (2009). Modification upon aging of the density of presynaptic modulation systems in the hippocampus. *Neurobiology of Aging*, 30(11), 1877–1884. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.01.003>
- Canas, P. M., Porciúncula, L. O., Cunha, G. M. A., Silva, C. G., Machado, N. J., Oliveira, J. M. A., ... Cunha, R. A. (2009). Adenosine A2A receptor blockade prevents synaptotoxicity and memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides via p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(47), 14741–14751. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3728-09.2009>
- Candelario-Jalil, E., Dijkhuizen, R. M., & Magnus, T. (2022). Neuroinflammation, Stroke, Blood-Brain Barrier Dysfunction, and Imaging Modalities. *Stroke*, 53(5), 1473–1486. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.122.036946>
- Cao, C., Li, Y., Liu, H., Bai, G., Mayl, J., Lin, X., ... Cai, J. (2014). The potential therapeutic effects of THC on Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 42(3), 973–984. <https://doi.org/10.3233/JAD-140093>
- Carman, A. J., Mills, J. H., Krenz, A., Kim, D.-G., & Bynoe, M. S. (2011). Adenosine receptor signaling modulates permeability of the blood-brain barrier. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(37), 13272–13280. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3337-11.2011>
- Carpenter, B., & Lebon, G. (2017). Human Adenosine A2A Receptor: Molecular Mechanism of Ligand Binding and Activation. *Frontiers in Pharmacology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00898>
- Carriba, P., Ortiz, O., Patkar, K., Justinova, Z., Stroik, J., Themann, A., ... Ferré, S. (2007a). Striatal adenosine A2A and cannabinoid CB1 receptors form functional heteromeric complexes that mediate the motor effects of cannabinoids.

- Neuropsychopharmacology*, 32(11), 2249–2259.
<https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301375>
- Carriba, P., Ortiz, O., Patkar, K., Justinova, Z., Stroik, J., Themann, A., ... Ferré, S. (2007b). Striatal Adenosine A2A and Cannabinoid CB1 Receptors Form Functional Heteromeric Complexes that Mediate the Motor Effects of Cannabinoids. *Neuropsychopharmacology*, 32(11), 2249–2259.
<https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301375>
- Carvalho, K., Faivre, E., Pietrowski, M. J., Marques, X., Gomez-Murcia, V., Deleau, A., ... Blum, D. (2019). Exacerbation of C1q dysregulation, synaptic loss and memory deficits in tau pathology linked to neuronal adenosine A2A receptor. *Brain : A Journal of Neurology*, 142(11), 3636–3654. <https://doi.org/10.1093/brain/awz288>
- Casella, R., & Cecchi, C. (2021). Calcium Dyshomeostasis in Alzheimer's Disease Pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9).
<https://doi.org/10.3390/ijms22094914>
- Cascio, M. G., Zamberletti, E., Marini, P., Parolaro, D., & Pertwee, R. G. (2015). The phytocannabinoid, Δ^9 -tetrahydrocannabivarin, can act through 5-HT_{1A} receptors to produce antipsychotic effects. *British Journal of Pharmacology*, 172(5), 1305–1318.
<https://doi.org/10.1111/bph.13000>
- Caseley, E. A., Muench, S. P., Roger, S., Mao, H.-J., Baldwin, S. A., & Jiang, L.-H. (2014). Non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the P2X receptor genes: association with diseases, impact on receptor functions and potential use as diagnosis biomarkers. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(8), 13344–13371.
<https://doi.org/10.3390/ijms150813344>
- Cassard, S. D., Fitzgerald, K. C., Qian, P., Emrich, S. A., Azevedo, C. J., Goodman, A. D., ... Mowry, E. M. (2023). High-dose vitamin D₃ supplementation in relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised clinical trial. *EClinicalMedicine*, 59.
<https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2023.101957>
- Castillo, P. E., Younts, T. J., Chávez, A. E., & Hashimoto, Y. (2012). Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron*, 76(1), 70–81.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.020>
- Cattaneo, A., Cattane, N., Galluzzi, S., Provasi, S., Lopizzo, N., Festari, C., ... Frisoni, G. B. (2017). Association of brain amyloidosis with pro-inflammatory gut bacterial taxa and peripheral inflammation markers in cognitively impaired elderly. *Neurobiology of Aging*, 49, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.08.019>
- Chan, H. C. S., Li, Y., Dahoun, T., Vogel, H., & Yuan, S. (2019). New Binding Sites, New Opportunities for GPCR Drug Discovery. *Trends in Biochemical Sciences*, 44(4), 312–330. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.11.011>
- Chanda, D., Kim, D.-K., Li, T., Kim, Y.-H., Koo, S.-H., Lee, C.-H., ... Choi, H.-S. (2011). Cannabinoid Receptor Type 1 (CB1R) Signaling Regulates Hepatic Gluconeogenesis via Induction of Endoplasmic Reticulum-bound Transcription Factor cAMP-responsive Element-binding Protein H (CREBH) in Primary Hepatocytes*. *Journal of Biological Chemistry*, 286(32), 27971–27979.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.224352>
- Chang, A. E., Shilling, D. J., Stillman, R. C., Goldberg, N. H., Seipp, C. A., Barofsky, I., ... Rosenberg, S. A. (1979). Delta-9-tetrahydrocannabinol as an antiemetic in cancer patients receiving high-dose methotrexate. A prospective, randomized evaluation. *Annals of Internal Medicine*, 91(6), 819–824. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-91->

- Chen, C.-Y., Bonham, A. C., Dean, C., Hopp, F. A., Hillard, C. J., & Seagard, J. L. (2010). Retrograde release of endocannabinoids inhibits presynaptic GABA release to second-order baroreceptive neurons in NTS. *Autonomic Neuroscience : Basic & Clinical*, 158(1–2), 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2010.06.001>
- Chen, G., Xie, R.-G., Gao, Y.-J., Xu, Z.-Z., Zhao, L.-X., Bang, S., ... Ji, R.-R. (2016). β -arrestin-2 regulates NMDA receptor function in spinal lamina II neurons and duration of persistent pain. *Nature Communications*, 7, 12531. <https://doi.org/10.1038/ncomms12531>
- Chen, X., Zhang, J., & Chen, C. (2011). Endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol protects neurons against β -amyloid insults. *Neuroscience*, 178, 159–168. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.01.024>
- Cherchi, F., Pugliese, A. M., & Coppi, E. (2021). Oligodendrocyte precursor cell maturation: role of adenosine receptors. *Neural Regeneration Research*, 16(9), 1686–1692. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.306058>
- Choi, I. Y., Lee, J. C., Ju, C., Hwang, S., Cho, G. S., Lee, H. W., ... Kim, W. K. (2011). A3 adenosine receptor agonist reduces brain ischemic injury and inhibits inflammatory cell migration in rats. *American Journal of Pathology*, 179(4), 2042–2052. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.07.006>
- Choi, S.-H., Arai, A. L., Mou, Y., Kang, B., Yen, C. C.-C., Hallenbeck, J., & Silva, A. C. (2018). Neuroprotective Effects of MAGL (Monoacylglycerol Lipase) Inhibitors in Experimental Ischemic Stroke. *Stroke*, 49(3), 718–726. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.117.019664>
- Ciruela, F., Casadó, V., Mallol, J., Canela, E. I., Lluís, C., & Franco, R. (1995). Immunological identification of A1 adenosine receptors in brain cortex. *Journal of Neuroscience Research*, 42(6), 818–828. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jnr.490420610>
- Ciruela, Francisco, Casadó, V., Rodrigues, R. J., Luján, R., Burgueño, J., Canals, M., ... Franco, R. (2006). Presynaptic Control of Striatal Glutamatergic Neurotransmission by Adenosine A₁ and A_{2A} Receptor Heteromers. *The Journal of Neuroscience*, 26(7), 2080 LP – 2087. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3574-05.2006>
- Colasanti, B. K. (1990). A comparison of the ocular and central effects of delta 9-tetrahydrocannabinol and cannabigerol. *Journal of Ocular Pharmacology*, 6(4), 259–269. <https://doi.org/10.1089/jop.1990.6.259>
- Comi, G., Cook, S., Giovannoni, G., Rieckmann, P., Sørensen, P. S., Vermersch, P., ... Dangond, F. (2019). Effect of cladribine tablets on lymphocyte reduction and repopulation dynamics in patients with relapsing multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 29, 168–174. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2019.01.038>
- Cooper, G. M. T. A.-T. T.-. (2000). *The cell : a molecular approach* (2nd ed NV). 2nd ed NV. <https://doi.org/LK> - <https://worldcat.org/title/43708665>
- Cristóvão-Ferreira, S., Navarro, G., Brugarolas, M., Pérez-Capote, K., Vaz, S. H., Fattorini, G., ... Sebastião, A. M. (2013). A1R-A2AR heteromers coupled to Gs and Gi/o proteins modulate GABA transport into astrocytes. *Purinergic Signalling*, 9(3), 433–449. <https://doi.org/10.1007/s11302-013-9364-5>
- Dall'Igna, O. P., Porciúncula, L. O., Souza, D. O., Cunha, R. A., & Lara, D. R. (2003, April). Neuroprotection by caffeine and adenosine A2A receptor blockade of beta-amyloid

- neurotoxicity. *British Journal of Pharmacology*, Vol. 138, pp. 1207–1209.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705185>
- Datta, G., Colasanti, A., Kalk, N., Owen, D., Scott, G., Rabiner, E. A., ... Matthews, P. M. (2017). (11)C-PBR28 and (18)F-PBR111 Detect White Matter Inflammatory Heterogeneity in Multiple Sclerosis. *Journal of Nuclear Medicine : Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, 58(9), 1477–1482. <https://doi.org/10.2967/jnumed.116.187161>
- De Luca, M. A., Solinas, M., Bimpisidis, Z., Goldberg, S. R., & Di Chiara, G. (2012). Cannabinoid facilitation of behavioral and biochemical hedonic taste responses. *Neuropharmacology*, 63(1), 161–168.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.10.018>
- De Meij, J., Alfaneek, Z., Morel, L., Decoeur, F., Leyrolle, Q., Picard, K., ... Nadjar, A. (2021). Microglial Cannabinoid Type 1 Receptor Regulates Brain Inflammation in a Sex-Specific Manner. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 6(6), 488–507.
<https://doi.org/10.1089/can.2020.0170>
- de Mello Schier, A. R., de Oliveira Ribeiro, N. P., Coutinho, D. S., Machado, S., Arias-Carrión, O., Crippa, J. A., ... Silva, A. C. (2014). Antidepressant-like and anxiolytic-like effects of cannabidiol: a chemical compound of Cannabis sativa. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, 13(6), 953–960.
<https://doi.org/10.2174/1871527313666140612114838>
- De Sousa, R. A. L. (2022). Reactive gliosis in Alzheimer's disease: a crucial role for cognitive impairment and memory loss. *Metabolic Brain Disease*, 37(4), 851–857.
<https://doi.org/10.1007/s11011-022-00953-2>
- Dehghani, R., Rahmani, F., & Rezaei, N. (2018). MicroRNA in Alzheimer's disease revisited: implications for major neuropathological mechanisms. *Reviews in the Neurosciences*, 29(2), 161–182. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2017-0042>
- Delacrétaiz, E. (2006). Clinical practice. Supraventricular tachycardia. *The New England Journal of Medicine*, 354(10), 1039–1051. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp051145>
- Deng, A., Valdivielso, J. M., Munger, K. A., Blantz, R. C., & Thomson, S. C. (2002). Vasodilatory N-methyl-D-aspartate receptors are constitutively expressed in rat kidney. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 13(5), 1381–1384.
<https://doi.org/10.1097/01.asn.0000013293.11876.4e>
- DeNinno, M. P. (1998). Chapter 11 - Adenosine (J. A. B. T.-A. R. in M. C. Bristol, Ed.).
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-7743\(08\)61076-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-7743(08)61076-3)
- Di Marzo, V., Piscitelli, F., & Mechoulam, R. (2011). *Cannabinoids and Endocannabinoids in Metabolic Disorders with Focus on Diabetes BT - Diabetes - Perspectives in Drug Therapy* (M. Schwanstecher, Ed.). https://doi.org/10.1007/978-3-642-17214-4_4
- Di Virgilio, F., Sarti, A. C., & Coutinho-Silva, R. (2020). Purinergic signaling, DAMPs, and inflammation. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 318(5), C832–C835.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00053.2020>
- Ding, J. J., Luo, A. F., Hu, L. Y., Wang, D. C., & Shao, F. (2014). Structural basis of the ultrasensitive calcium indicator GCaMP6. *Science China Life Sciences*, 57(3), 269–274.
<https://doi.org/10.1007/s11427-013-4599-5>
- Docagne, F., Muñetón, V., Clemente, D., Ali, C., Loría, F., Correa, F., ... Guaza, C. (2007). Excitotoxicity in a chronic model of multiple sclerosis: Neuroprotective effects of cannabinoids through CB1 and CB2 receptor activation. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 34(4), 551–561.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mcn.2006.12.005>

- Dong, Q., Ginsberg, H. N., & Erlanger, B. F. (2001). Overexpression of the A1 adenosine receptor in adipose tissue protects mice from obesity-related insulin resistance. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 3(5), 360–366. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1463-1326.2001.00158.x>
- Dotsey, E., Ushach, I., Pone, E., Nakajima, R., Jasinskas, A., Argueta, D. A., ... Felgner, P. L. (2017). Transient Cannabinoid Receptor 2 Blockade during Immunization Heightens Intensity and Breadth of Antigen-specific Antibody Responses in Young and Aged mice. *Scientific Reports*, 7, 42584. <https://doi.org/10.1038/srep42584>
- Dunwiddie, T. V., & Haas, H. L. (1985). Adenosine increases synaptic facilitation in the in vitro rat hippocampus: evidence for a presynaptic site of action. *The Journal of Physiology*, 369, 365–377. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1985.sp015907>
- Dunwiddie, T. V., & Masino, S. A. (2001). The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annual Review of Neuroscience*, 24, 31–55. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.31>
- Ebers, G. C. (2004). Natural history of primary progressive multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 10(3_suppl), S8–S15. <https://doi.org/10.1191/1352458504ms1025oa>
- Eftekharzadeh, B., Daigle, J. G., Kapinos, L. E., Coyne, A., Schiantarelli, J., Carlomagno, Y., ... Hyman, B. T. (2018). Tau Protein Disrupts Nucleocytoplasmic Transport in Alzheimer's Disease. *Neuron*, 99(5), 925–940.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.07.039>
- Elsohly, H. N., Turner, C. E., Clark, A. M., & Elsohly, M. A. (1982). Synthesis and Antimicrobial Activities of Certain Cannabichromene and Cannabigerol Related Compounds. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71(12), 1319–1323. <https://doi.org/10.1002/jps.2600711204>
- Erny, D., Hrabě de Angelis, A. L., Jaitin, D., Wieghofer, P., Staszewski, O., David, E., ... Prinz, M. (2015). Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nature Neuroscience*, 18(7), 965–977. <https://doi.org/10.1038/nn.4030>
- Escartin, C., Galea, E., Lakatos, A., O'Callaghan, J. P., Petzold, G. C., Serrano-Pozo, A., ... Verkhratsky, A. (2021). Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nature Neuroscience*, 24(3), 312–325. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00783-4>
- Ezeamuzie, C. I., & Philips, E. (1999). Adenosine A3 receptors on human eosinophils mediate inhibition of degranulation and superoxide anion release. *British Journal of Pharmacology*, 127(1), 188–194. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702476>
- Faivre, E., Coelho, J. E., Zornbach, K., Malik, E., Baqi, Y., Schneider, M., ... Blum, D. (2018). Beneficial Effect of a Selective Adenosine A2A Receptor Antagonist in the APPswe/PS1dE9 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00235>
- Fani, G., Mannini, B., Vecchi, G., Cascella, R., Cecchi, C., Dobson, C. M., ... Chiti, F. (2021). Aβ Oligomers Dysregulate Calcium Homeostasis by Mechanosensitive Activation of AMPA and NMDA Receptors. *ACS Chemical Neuroscience*, 12(4), 766–781. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.0c00811>
- Farina, C., Aloisi, F., & Meinl, E. (2007). Astrocytes are active players in cerebral innate

- immunity. *Trends in Immunology*, 28(3), 138–145.
<https://doi.org/10.1016/j.it.2007.01.005>
- Farr, S. A., Cuzzocrea, S., Esposito, E., Campolo, M., Niehoff, M. L., Doyle, T. M., & Salvemini, D. (2020). Adenosine A3 receptor as a novel therapeutic target to reduce secondary events and improve neurocognitive functions following traumatic brain injury. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1), 339. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-02009-7>
- Fedorova, I. M., Jacobson, M. A., Basile, A., & Jacobson, K. A. (2003). Behavioral Characterization of Mice Lacking the A3 Adenosine Receptor: Sensitivity to Hypoxic Neurodegeneration. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 23(3), 431–447.
<https://doi.org/10.1023/A:1023601007518>
- Fernández-Dueñas, V., Pérez-Arévalo, A., Altafaj, X., Ferré, S., & Ciruela, F. (2017). Adenosine A1-A2A Receptor Heteromer as a Possible Target for Early-Onset Parkinson's Disease. *Frontiers in Neuroscience*, 11.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00652>
- Fernández-Rodríguez, C. M., Romero, J., Petros, T. J., Bradshaw, H., Gasalla, J. M., Gutiérrez, M. L., ... Walker, J. M. (2004). Circulating endogenous cannabinoid anandamide and portal, systemic and renal hemodynamics in cirrhosis. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 24(5), 477–483.
<https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2004.0945.x>
- Ferré, S. (2010). Role of the central ascending neurotransmitter systems in the psychostimulant effects of caffeine. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 20 Suppl 1(Suppl 1), S35-49. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1400>
- Ferré, S., Bonaventura, J., Zhu, W., Hatcher-Solis, C., Taura, J., Quiroz, C., ... Zwillig, D. (2018). Essential control of the function of the striatopallidal neuron by pre-coupled complexes of adenosine A2A-dopamine D2 receptor heterotetramers and adenylyl cyclase. *Frontiers in Pharmacology*, 9(APR), 1–18.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00243>
- Ferré, S., & Ciruela, F. (2019). Functional and Neuroprotective Role of Striatal Adenosine A2A Receptor Heterotetramers. *Journal of Caffeine and Adenosine Research*, 9(3), 89–97. <https://doi.org/10.1089/caff.2019.0008>
- Ferré, S., Ciruela, F., Dessauer, C. W., González-Maeso, J., Hébert, T. E., Jockers, R., ... Pardo, L. (2022). G protein-coupled receptor-effector macromolecular membrane assemblies (GEMMAs). *Pharmacology & Therapeutics*, 231, 107977.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107977>
- Ferré, S., & Franco, R. (2010, February). Oligomerization of G-protein-coupled receptors: a reality. *Current Opinion in Pharmacology*, Vol. 10, pp. 1–5.
<https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.11.002>
- Ferré, S., Sarasola, L. I., Quiroz, C., & Ciruela, F. (2023). Presynaptic adenosine receptor heteromers as key modulators of glutamatergic and dopaminergic neurotransmission in the striatum. *Neuropharmacology*, 223, 109329.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2022.109329>
- Ferreira-Silva, J., Aires, I. D., Boia, R., Ambrósio, A. F., & Santiago, A. R. (2020). Activation of adenosine a3 receptor inhibits microglia reactivity elicited by elevated pressure. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 1–15.
<https://doi.org/10.3390/ijms21197218>

- Fishman, P. (2022). Drugs Targeting the A3 Adenosine Receptor: Human Clinical Study Data. *Molecules*, Vol. 27. <https://doi.org/10.3390/molecules27123680>
- Flores-Soto, M. E., Chaparro-Huerta, V., Escoto-Delgadillo, M., Vazquez-Valls, E., González-Castañeda, R. E., & Beas-Zarate, C. (2012). [Structure and function of NMDA-type glutamate receptor subunits]. *Neurologia (Barcelona, Spain)*, 27(5), 301–310. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2011.10.014>
- Forero, D. A., González-Giraldo, Y., Castro-Vega, L. J., & Barreto, G. E. (2019). qPCR-based methods for expression analysis of miRNAs. *BioTechniques*, 67(4), 192–199. <https://doi.org/10.2144/btn-2019-0065>
- Franco, R, Lluís, C., Canela, E. I., Mallol, J., Agnati, L., Casadó, V., ... Fuxe, K. (2007). Receptor–receptor interactions involving adenosine A1 or dopamine D1 receptors and accessory proteins. *Journal of Neural Transmission*, 114(1), 93–104. <https://doi.org/10.1007/s00702-006-0566-7>
- Franco, Rafael, Aguinaga, D., Jiménez, J., Lillo, J., Martínez-Pinilla, E., & Navarro, G. (2018). Biased receptor functionality versus biased agonism in G-protein-coupled receptors. *Biomolecular Concepts*, 9(1), 143–154. <https://doi.org/doi:10.1515/bmc-2018-0013>
- Franco, Rafael, Rivas-Santisteban, R., Casanovas, M., Lillo, A., Saura, C. A., & Navarro, G. (2020). Adenosine A(2A) Receptor Antagonists Affects NMDA Glutamate Receptor Function. Potential to Address Neurodegeneration in Alzheimer's Disease. *Cells*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/cells9051075>
- Franzmeier, N., Neitzel, J., Rubinski, A., Smith, R., Strandberg, O., Ossenkoppele, R., ... Ewers, M. (2020). Functional brain architecture is associated with the rate of tau accumulation in Alzheimer's disease. *Nature Communications*, 11(1), 347. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14159-1>
- Fredholm, B. B., Arslan, G., Halldner, L., Kull, B., Schulte, G., & Wasserman, W. (2000). Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 362(4), 364–374. <https://doi.org/10.1007/s002100000313>
- Fulmer, C. G., VonDran, M. W., Stillman, A. A., Huang, Y., Hempstead, B. L., & Dreyfus, C. F. (2014). Astrocyte-derived BDNF supports myelin protein synthesis after cuprizone-induced demyelination. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(24), 8186–8196. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4267-13.2014>
- Gagne, S. J., Stout, J. M., Liu, E., Boubakir, Z., Clark, S. M., & Page, J. E. (2012). Identification of olivetolic acid cyclase from Cannabis sativa reveals a unique catalytic route to plant polyketides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(31), 12811–12816. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200330109>
- Gainetdinov, R. R., Premont, R. T., Bohn, L. M., Lefkowitz, R. J., & Caron, M. G. (2004). DESENSITIZATION OF G PROTEIN-COUPLED RECEPTORS AND NEURONAL FUNCTIONS. *Annual Review of Neuroscience*, 27(1), 107–144. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144206>
- Galimberti, D., Villa, C., Fenoglio, C., Serpente, M., Ghezzi, L., Cioffi, S. M. G., ... Scarpini, E. (2014). Circulating miRNAs as potential biomarkers in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 42(4), 1261–1267. <https://doi.org/10.3233/JAD-140756>
- Galloway, D. A., Williams, J. B., & Moore, C. S. (2017). Effects of fumarates on inflammatory human astrocyte responses and oligodendrocyte differentiation. *Annals of Clinical*

- and *Translational Neurology*, 4(6), 381–391. <https://doi.org/10.1002/acn3.414>
- Ganesana, M., & Venton, B. J. (2018). Early changes in transient adenosine during cerebral ischemia and reperfusion injury. *PloS One*, 13(5), e0196932. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196932>
- Gaoni, Y., & Mechoulam, R. (1964). Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *Journal of the American Chemical Society*, 86(8), 1646–1647. <https://doi.org/10.1021/ja01062a046>
- Garcia-Arencibia, M., Molina-Holgado, E., & Molina-Holgado, F. (2019). Effect of endocannabinoid signalling on cell fate: life, death, differentiation and proliferation of brain cells. *British Journal of Pharmacology*, 176(10), 1361–1369. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/bph.14369>
- Gareau, M. G. (2014). Microbiota-gut-brain axis and cognitive function. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 817, 357–371. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0897-4_16
- Gawde, S., Agasing, A., Bhatt, N., Toliver, M., Kumar, G., Massey, K., ... Axtell, R. C. (2022). Biomarker panel increases accuracy for identification of an MS relapse beyond sNfL. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 63. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2022.103922>
- Genchi, A., Brambilla, E., Sangalli, F., Radaelli, M., Bacigaluppi, M., Furlan, R., ... Martino, G. (2023). Neural stem cell transplantation in patients with progressive multiple sclerosis: an open-label, phase 1 study. *Nature Medicine*, 29(1), 75–85. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-02097-3>
- Gessi, S., Merighi, S., Fazzi, D., Stefanelli, A., Varani, K., & Borea, P. A. (2011). Adenosine receptor targeting in health and disease. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 20(12), 1591–1609. <https://doi.org/10.1517/13543784.2011.627853>
- Ghaiad, H. R., Nooh, M. M., El-Sawalhi, M. M., & Shaheen, A. A. (2017). Resveratrol Promotes Remyelination in Cuprizone Model of Multiple Sclerosis: Biochemical and Histological Study. *Molecular Neurobiology*, 54(5), 3219–3229. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9891-5>
- Ginés, S., Hillion, J., Torvinen, M., Le Crom, S., Casadó, V., Canela, E. I., ... Franco, R. (2000). Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(15), 8606–8611. <https://doi.org/10.1073/pnas.150241097>
- Gomes, C., Ferreira, R., George, J., Sanches, R., Rodrigues, D. I., Gonçalves, N., & Cunha, R. A. (2013). Activation of microglial cells triggers a release of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) inducing their proliferation in an adenosine A2A receptor-dependent manner: A2A receptor blockade prevents BDNF release and proliferation of microglia. *Journal of Neuroinflammation*, 10, 16. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-10-16>
- Gomes, I., Ayoub, M. A., Fujita, W., Jaeger, W. C., Pflieger, K. D. G., & Devi, L. A. (2016). G Protein-Coupled Receptor Heteromers. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 56, 403–425. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011613-135952>
- Gómez-Ruiz, M., Rodríguez-Cueto, C., Luna-Piñel, E., Hernández-Gálvez, M., & Fernández-Ruiz, J. (2019). Endocannabinoid System in Spinocerebellar Ataxia Type-3 and Other Autosomal-Dominant Cerebellar Ataxias: Potential Role in Pathogenesis and

Expected Relevance as Neuroprotective Targets . *Frontiers in Molecular Neuroscience* , Vol. 12. Retrieved from <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2019.00094>

- Gómez Del Pulgar, T., De Ceballos, M. L., Guzmán, M., & Velasco, G. (2002). Cannabinoids protect astrocytes from ceramide-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(39), 36527–36533. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205797200>
- Gonçalves, F. Q., Lopes, J. P., Silva, H. B., Lemos, C., Silva, A. C., Gonçalves, N., ... Cunha, R. A. (2019). Synaptic and memory dysfunction in a β -amyloid model of early Alzheimer's disease depends on increased formation of ATP-derived extracellular adenosine. *Neurobiology of Disease*, 132, 104570. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104570>
- Grim, T. W., Morales, A. J., Gonek, M. M., Wiley, J. L., Thomas, B. F., Endres, G. W., ... Lichtman, A. H. (2016). Stratification of Cannabinoid 1 Receptor (CB1R) Agonist Efficacy: Manipulation of CB1R Density through Use of Transgenic Mice Reveals Congruence between In Vivo and In Vitro Assays. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 359(2), 329–339. <https://doi.org/10.1124/jpet.116.233163>
- Gu, L., & Guo, Z. (2013). Alzheimer's A β 42 and A β 40 peptides form interlaced amyloid fibrils. *Journal of Neurochemistry*, 126(3), 305–311. <https://doi.org/10.1111/jnc.12202>
- Guadaño-Ferraz, A., Viñuela, A., Oeding, G., Bernal, J., & Rausell, E. (2005). RC3/neurogranin is expressed in pyramidal neurons of motor and somatosensory cortex in normal and denervated monkeys. *The Journal of Comparative Neurology*, 493(4), 554–570. <https://doi.org/10.1002/cne.20774>
- Gülck, T., & Møller, B. L. (2020). Phytocannabinoids: Origins and Biosynthesis. *Trends in Plant Science*, 25(10), 985–1004. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.05.005>
- Gunasekera, B., Diederer, K., & Bhattacharyya, S. (2022). Cannabinoids, reward processing, and psychosis. *Psychopharmacology*, 239(5), 1157–1177. <https://doi.org/10.1007/s00213-021-05801-2>
- Gundry, J., Glenn, R., Alagesan, P., & Rajagopal, S. (2017). A Practical Guide to Approaching Biased Agonism at G Protein Coupled Receptors. *Frontiers in Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00017>
- Gurevich, V. V., & Gurevich, E. V. (2019). GPCR Signaling Regulation: The Role of GRKs and Arrestins. *Frontiers in Pharmacology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00125>
- Gusach, A., García-Nafría, J., & Tate, C. G. (2023). New insights into GPCR coupling and dimerisation from cryo-EM structures. *Current Opinion in Structural Biology*, 80, 102574. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sbi.2023.102574>
- Gustavsson, A., Norton, N., Fast, T., Frölich, L., Georges, J., Holzapfel, D., ... van der Flier, W. M. (2023). Global estimates on the number of persons across the Alzheimer's disease continuum. *Alzheimer's & Dementia : The Journal of the Alzheimer's Association*, 19(2), 658–670. <https://doi.org/10.1002/alz.12694>
- Han, H., Liang, X., Wang, J., Zhao, Q., Yang, M., Rong, W., & Zhang, G. (2017). Cannabinoid receptor 1 contributes to sprouted innervation in endometrial ectopic growth through mitogen-activated protein kinase activation. *Brain Research*, 1663, 132–140.

<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.03.016>

- Hardingham, G. E., & Bading, H. (2010). Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nature Reviews. Neuroscience*, 11(10), 682–696. <https://doi.org/10.1038/nrn2911>
- Harris, V. K., Stark, J. W., Yang, S., Zanker, S., Tuddenham, J., & Sadiq, S. A. (2021). Mesenchymal stem cell-derived neural progenitors in progressive MS: Two-year follow-up of a phase I study. *Neurology(R) Neuroimmunology & Neuroinflammation*, 8(1). <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000928>
- Hauser, A. S., Attwood, M. M., Rask-Andersen, M., Schiöth, H. B., & Gloriam, D. E. (2017). Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(12), 829–842. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.178>
- Hauser, A. S., Chavali, S., Masuho, I., Jahn, L. J., Martemyanov, K. A., Gloriam, D. E., & Babu, M. M. (2018). Pharmacogenomics of GPCR Drug Targets. *Cell*, 172(1), 41–54.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.033>
- He, X., Chen, F., Zhang, Y., Gao, Q., Guan, Y., Wang, J., ... Li, T. (2020). Upregulation of adenosine A2A receptor and downregulation of GLT1 is associated with neuronal cell death in Rasmussen's encephalitis. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 30(2), 246–260. <https://doi.org/10.1111/bpa.12770>
- Hebert, T. E., Moffett, S., Morello, J. P., Loisel, T. P., Bichet, D. G., Barret, C., & Bouvier, M. (1996). A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(27), 16384–16392. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.27.16384>
- Heneka, M. T., Golenbock, D. T., & Latz, E. (2015). Innate immunity in Alzheimer's disease. *Nature Immunology*, 16(3), 229–236. <https://doi.org/10.1038/ni.3102>
- Hilger, D. (2021). The role of structural dynamics in GPCR-mediated signaling. *The FEBS Journal*, 288(8), 2461–2489. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/febs.15841>
- Hill, S. J., May, L. T., Kellam, B., & Woolard, J. (2014). Allosteric interactions at adenosine A1 and A3 receptors: new insights into the role of small molecules and receptor dimerization. *British Journal of Pharmacology*, 171(5), 1102–1113. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/bph.12345>
- Hillard, C. J. (2018). Circulating Endocannabinoids: From Whence Do They Come and Where are They Going? *Neuropsychopharmacology*, 43(1), 155–172. <https://doi.org/10.1038/npp.2017.130>
- Hinoi, E., Takarada, T., Ueshima, T., Tsuchihashi, Y., & Yoneda, Y. (2004). Glutamate signaling in peripheral tissues. *European Journal of Biochemistry*, 271(1), 1–13. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03907.x>
- Ho, M.-L., Tsai, T.-N., Chang, J.-K., Shao, T.-S., Jeng, Y.-R., & Hsu, C. (2005). Down-regulation of N-methyl D-aspartate receptor in rat-modeled disuse osteopenia. *Osteoporosis International : A Journal Established as Result of Cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 16(12), 1780–1788. <https://doi.org/10.1007/s00198-005-1928-y>
- Höftberger, R., & Lassmann, H. (2017). Inflammatory demyelinating diseases of the central nervous system. *Handbook of Clinical Neurology*, 145, 263–283. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802395-2.00019-5>
- Honarpisheh, P., Reynolds, C. R., Blasco Conesa, M. P., Moruno Manchon, J. F., Putluri, N.,

- Bhattacharjee, M. B., ... Ganesh, B. P. (2020). Dysregulated Gut Homeostasis Observed Prior to the Accumulation of the Brain Amyloid- β in Tg2576 Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5). <https://doi.org/10.3390/ijms21051711>
- Hong, S., Dissing-Olesen, L., & Stevens, B. (2016). New insights on the role of microglia in synaptic pruning in health and disease. *Current Opinion in Neurobiology*, 36, 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.12.004>
- Hou, X., Li, Y., Huang, Y., Zhao, H., & Gui, L. (2020). Adenosine Receptor A1-A2a Heteromers Regulate EAAT2 Expression and Glutamate Uptake via YY1-Induced Repression of PPAR γ Transcription. *PPAR Research*, 2020, 2410264. <https://doi.org/10.1155/2020/2410264>
- Howell, O. W., Reeves, C. A., Nicholas, R., Carassiti, D., Radotra, B., Gentleman, S. M., ... Reynolds, R. (2011). Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. *Brain : A Journal of Neurology*, 134(Pt 9), 2755–2771. <https://doi.org/10.1093/brain/awr182>
- Howlett, A. C. (2005). Cannabinoid Receptor Signalling. In *Handbook of Experimental Pharmacology* (pp. 53–79).
- Hu, S. S.-J., Bradshaw, H. B., Chen, J. S.-C., Tan, B., & Walker, J. M. (2008). Prostaglandin E2 glycerol ester, an endogenous COX-2 metabolite of 2-arachidonoylglycerol, induces hyperalgesia and modulates NF κ B activity. *British Journal of Pharmacology*, 153(7), 1538–1549. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.33>
- Hübner, H., Schellhorn, T., Gienger, M., Schaab, C., Kaindl, J., Leeb, L., ... Gmeiner, P. (2016). Structure-guided development of heterodimer-selective GPCR ligands. *Nature Communications*, 7(1), 12298. <https://doi.org/10.1038/ncomms12298>
- Hynd, M. R., Scott, H. L., & Dodd, P. R. (2001). Glutamate(NMDA) receptor NR1 subunit mRNA expression in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 78(1), 175–182. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00409.x>
- Ilyasov, A. A., Milligan, C. E., Pharr, E. P., & Howlett, A. C. (2018). The Endocannabinoid System and Oligodendrocytes in Health and Disease. *Frontiers in Neuroscience*, 12, 733. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00733>
- Jacobson, K. A., & Gao, Z.-G. (2009). *Adenosine* (L. R. B. T.-E. of N. Squire, Ed.). [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.00627-6](https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.00627-6)
- Jadoon, K. A., Ratcliffe, S. H., Barrett, D. A., Thomas, E. L., Stott, C., Bell, J. D., ... Tan, G. D. (2016). Efficacy and Safety of Cannabidiol and Tetrahydrocannabivarin on Glycemic and Lipid Parameters in Patients With Type 2 Diabetes: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Parallel Group Pilot Study. *Diabetes Care*, 39(10), 1777–1786. <https://doi.org/10.2337/dc16-0650>
- Jain, T., Wager-Miller, J., Mackie, K., & Straiker, A. (2013). Diacylglycerol Lipase α (DAGL α) and DAGL β Cooperatively Regulate the Production of 2-Arachidonoyl Glycerol in Autaptic Hippocampal Neurons. *Molecular Pharmacology*, 84(2), 296 LP – 302. <https://doi.org/10.1124/mol.113.085217>
- James, P. Klaas, M. D. (2022). Diagnosing Alzheimer's: How Alzheimer's is diagnosed. Retrieved from Mayo Clinic website: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/alzheimers-disease/in-depth/alzheimers/art-20048075>
- Jarrahian, A., Watts, V. J., & Barker, E. L. (2004). D2 dopamine receptors modulate Galpha-subunit coupling of the CB1 cannabinoid receptor. *The Journal of Pharmacology and*

- Experimental Therapeutics*, 308(3), 880–886.
<https://doi.org/10.1124/jpet.103.057620>
- Jin, Y., Tu, Q., & Liu, M. (2018). MicroRNA-125b regulates Alzheimer's disease through SphK1 regulation. *Molecular Medicine Reports*, 18(2), 2373–2380.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9156>
- Johansson, S. M., Lindgren, E., Yang, J.-N., Herling, A. W., & Fredholm, B. B. (2008). Adenosine A1 receptors regulate lipolysis and lipogenesis in mouse adipose tissue — Interactions with insulin. *European Journal of Pharmacology*, 597(1), 92–101.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.08.022>
- John, G. R., Lee, S. C., & Brosnan, C. F. (2003). Cytokines: powerful regulators of glial cell activation. *The Neuroscientist : A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 9(1), 10–22. <https://doi.org/10.1177/1073858402239587>
- Johnston, J. B., Silva, C., Gonzalez, G., Holden, J., Warren, K. G., Metz, L. M., & Power, C. (2001). Diminished adenosine A1 receptor expression on macrophages in brain and blood of patients with multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 49(5), 650–658.
<https://doi.org/10.1002/ana.1007>
- Jones, K. R., Choi, U., Gao, J.-L., Thompson, R. D., Rodman, L. E., Malech, H. L., & Kang, E. M. (2017). A Novel Method for Screening Adenosine Receptor Specific Agonists for Use in Adenosine Drug Development. *Scientific Reports*, 7(1), 44816.
<https://doi.org/10.1038/srep44816>
- Kanno, T., Gotoh, A., Fujita, Y., Nakano, T., & Nishizaki, T. (2012). A(3) adenosine receptor mediates apoptosis in 5637 human bladder cancer cells by G(q) protein/PKC-dependent AIF upregulation. *Cellular Physiology and Biochemistry : International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 30(5), 1159–1168. <https://doi.org/10.1159/000343306>
- Kano, M., Ohno-Shosaku, T., Hashimoto-dani, Y., Uchigashima, M., & Watanabe, M. (2009). Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiological Reviews*, 89(1), 309–380. <https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2008>
- Kargl, J., Balenga, N., Parzmair, G. P., Brown, A. J., Heinemann, A., & Waldhoer, M. (2012). The Cannabinoid Receptor CB1 Modulates the Signaling Properties of the Lysophosphatidylinositol Receptor GPR55 *. *Journal of Biological Chemistry*, 287(53), 44234–44248. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.364109>
- Katona, I., & Freund, T. F. (2008). Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease. *Nature Medicine*, 14(9), 923–930.
<https://doi.org/10.1038/nm.f.1869>
- Kenakin, T. (1995). Agonist-receptor efficacy II: agonist trafficking of receptor signals. *Trends in Pharmacological Sciences*, 16(7), 232–238.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)89032-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)89032-X)
- Kester, M. I., Teunissen, C. E., Crimmins, D. L., Herries, E. M., Ladenson, J. H., Scheltens, P., ... Fagan, A. M. (2015). Neurogranin as a Cerebrospinal Fluid Biomarker for Synaptic Loss in Symptomatic Alzheimer Disease. *JAMA Neurology*, 72(11), 1275–1280.
<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2015.1867>
- Khan, H., Kaur, P., Singh, T. G., Grewal, A. K., & Sood, S. (2022). Adenosine as a Key Mediator of Neuronal Survival in Cerebral Ischemic Injury. *Neurochemical Research*, 47(12), 3543–3555. <https://doi.org/10.1007/s11064-022-03737-3>
- Khan, S. M., Sleno, R., Gora, S., Zylbergold, P., Laverdure, J.-P., Labbé, J.-C., ... Hébert, T. E.

- (2013). The Expanding Roles of G α Subunits in G Protein–Coupled Receptor Signaling and Drug Action. *Pharmacological Reviews*, 65(2), 545 LP – 577. <https://doi.org/10.1124/pr.111.005603>
- Khan, W. N. (2009). B cell receptor and BAFF receptor signaling regulation of B cell homeostasis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(6), 3561–3567. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0800933>
- Khoa, N. D., Postow, M., Danielsson, J., & Cronstein, B. N. (2006). Tumor necrosis factor- α prevents desensitization of G α s-coupled receptors by regulating GRK2 association with the plasma membrane. *Molecular Pharmacology*, 69(4), 1311–1319. <https://doi.org/10.1124/mol.105.016857>
- Khodadadi, H., Salles, É. L., Jarrahi, A., Costigliola, V., Khan, M. B., Yu, J. C., ... Baban, B. (2021). Cannabidiol Ameliorates Cognitive Function via Regulation of IL-33 and TREM2 Upregulation in a Murine Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, Vol. 80, pp. 973–977. <https://doi.org/10.3233/JAD-210026>
- Kibret, B. G., Canseco-Alba, A., Onaivi, E. S., & Engidawork, E. (2023). Crosstalk between the endocannabinoid and mid-brain dopaminergic systems: Implication in dopamine dysregulation. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 17, 1137957. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2023.1137957>
- Kim, R. Y., Hoffman, A. S., Itoh, N., Ao, Y., Spence, R., Sofroniew, M. V., & Voskuhl, R. R. (2014). Astrocyte CCL2 sustains immune cell infiltration in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology*, 274(1–2), 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.06.009>
- Kipp, M., Clarner, T., Dang, J., Copray, S., & Beyer, C. (2009). The cuprizone animal model: new insights into an old story. *Acta Neuropathologica*, 118(6), 723–736. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0591-3>
- Kirk, J., Plumb, J., Mirakhur, M., & McQuaid, S. (2003). Tight junctional abnormality in multiple sclerosis white matter affects all calibres of vessel and is associated with blood-brain barrier leakage and active demyelination. *The Journal of Pathology*, 201(2), 319–327. <https://doi.org/10.1002/path.1434>
- Klaasse, E. C., Ijzerman, A. P., de Grip, W. J., & Beukers, M. W. (2008). Internalization and desensitization of adenosine receptors. *Purinergic Signalling*, 4(1), 21–37. <https://doi.org/10.1007/s11302-007-9086-7>
- Klyubin, I., Wang, Q., Reed, M. N., Irving, E. A., Upton, N., Hofmeister, J., ... Rowan, M. J. (2011). Protection against A β -mediated rapid disruption of synaptic plasticity and memory by memantine. *Neurobiology of Aging*, 32(4), 614–623. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.04.005>
- Koda, K., Salazar-Rodriguez, M., Corti, F., Chan, N. Y.-K., Estephan, R., Silver, R. B., ... Levi, R. (2010). Aldehyde Dehydrogenase Activation Prevents Reperfusion Arrhythmias by Inhibiting Local Renin Release From Cardiac Mast Cells. *Circulation*, 122(8), 771–781. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.952481>
- Koehl, A., Hu, H., Feng, D., Sun, B., Zhang, Y., Robertson, M. J., ... Kobilka, B. K. (2019). Structural insights into the activation of metabotropic glutamate receptors. *Nature*, 566(7742), 79–84. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0881-4>
- Köfalvi, A., Moreno, E., Cordoní, A., Cai, N.-S., Fernández-Dueñas, V., Ferreira, S. G., ... Ferré, S. (2020). Control of glutamate release by complexes of adenosine and cannabinoid receptors. *BMC Biology*, 18(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s12915-020-0739-0>

- Koga, Y., Tsurumaki, H., Aoki-Saito, H., Sato, M., Yatomi, M., Takehara, K., & Hisada, T. (2019). Roles of Cyclic AMP Response Element Binding Activation in the ERK1/2 and p38 MAPK Signalling Pathway in Central Nervous System, Cardiovascular System, Osteoclast Differentiation and Mucin and Cytokine Production. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6). <https://doi.org/10.3390/ijms20061346>
- Kola, B., Farkas, I., Christ-Crain, M., Wittmann, G., Lolli, F., Amin, F., ... Korbónits, M. (2008). The orexigenic effect of ghrelin is mediated through central activation of the endogenous cannabinoid system. *PloS One*, 3(3), e1797. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001797>
- Kolakowski, L. F. J. (1994). GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors & Channels*, 2(1), 1–7.
- Krabbe, G., Halle, A., Matyash, V., Rinnenthal, J. L., Eom, G. D., Bernhardt, U., ... Heppner, F. L. (2013). Functional Impairment of Microglia Coincides with Beta-Amyloid Deposition in Mice with Alzheimer-Like Pathology. *PLOS ONE*, 8(4), e60921. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060921>
- Krumbholz, M., Theil, D., Derfuss, T., Rosenwald, A., Schrader, F., Monoranu, C.-M., ... Meinl, E. (2005). BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(2), 195–200. <https://doi.org/10.1084/jem.20041674>
- Kuhlmann, T., Ludwin, S., Prat, A., Antel, J., Brück, W., & Lassmann, H. (2017). An updated histological classification system for multiple sclerosis lesions. *Acta Neuropathologica*, 133(1), 13–24. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1653-y>
- Kunkl, M., Frascolla, S., Amormino, C., Volpe, E., & Tuosto, L. (2020). T Helper Cells: The Modulators of Inflammation in Multiple Sclerosis. *Cells*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/cells9020482>
- Kutzelnigg, A., & Lassmann, H. (2005). Cortical lesions and brain atrophy in MS. *Journal of the Neurological Sciences*, 233(1–2), 55–59. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2005.03.027>
- Kvartsberg, H., Duits, F. H., Ingelsson, M., Andreasen, N., Öhrfelt, A., Andersson, K., ... Blennow, K. (2015). Cerebrospinal fluid levels of the synaptic protein neurogranin correlates with cognitive decline in prodromal Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia : The Journal of the Alzheimer's Association*, 11(10), 1180–1190. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2014.10.009>
- La Rosa, G., Lonardo, M. S., Cacciapuoti, N., Muscariello, E., Guida, B., Faraonio, R., ... Damiano, S. (2023). Dietary Polyphenols, Microbiome, and Multiple Sclerosis: From Molecular Anti-Inflammatory and Neuroprotective Mechanisms to Clinical Evidence. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(8). <https://doi.org/10.3390/ijms24087247>
- Lambert, M. P., Barlow, A. K., Chromy, B. A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., ... Klein, W. L. (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1–42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(11), 6448–6453. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.6448>
- Lane, J. R., Abdul-Ridha, A., & Canals, M. (2013). Regulation of G protein-coupled receptors by allosteric ligands. *ACS Chemical Neuroscience*, 4(4), 527–534. <https://doi.org/10.1021/cn400005t>
- Lanznaster, D., Massari, C. M., Marková, V., Šimková, T., Duroux, R., Jacobson, K. A., ...

- Ciruela, F. (2019). Adenosine A(1)-A(2A) Receptor-Receptor Interaction: Contribution to Guanosine-Mediated Effects. *Cells*, 8(12).
<https://doi.org/10.3390/cells8121630>
- Laprairie, R. B., Bagher, A. M., Kelly, M. E. M., & Denovan-Wright, E. M. (2016). Biased Type 1 Cannabinoid Receptor Signaling Influences Neuronal Viability in a Cell Culture Model of Huntington Disease. *Molecular Pharmacology*, 89(3), 364–375.
<https://doi.org/10.1124/mol.115.101980>
- Laprairie, R. B., Stahl, E. L., & Bohn, L. M. (2017). Chapter Twelve - Approaches to Assess Biased Signaling at the CB1R Receptor. In P. H. B. T.-M. in E. Reggio (Ed.), *Cannabinoids and Their Receptors* (Vol. 593, pp. 259–279).
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.mie.2017.06.031>
- Larson, J., Lynch, G., Games, D., & Seubert, P. (1999). Alterations in synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampal slices from young and aged PDAPP mice. *Brain Research*, 840(1), 23–35. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)01698-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)01698-4)
- Lassmann, H., van Horssen, J., & Mahad, D. (2012). Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. *Nature Reviews. Neurology*, 8(11), 647–656.
<https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.168>
- Latorraca, N. R., Venkatakrishnan, A. J., & Dror, R. O. (2017). GPCR Dynamics: Structures in Motion. *Chemical Reviews*, 117(1), 139–155.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00177>
- Laurent, C., Burnouf, S., Ferry, B., Batalha, V. L., Coelho, J. E., Baqi, Y., ... Blum, D. (2016). A2A adenosine receptor deletion is protective in a mouse model of Tauopathy. *Molecular Psychiatry*, 21(1), 97–107. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.151>
- Lavoie, C., Mercier, J.-F., Salahpour, A., Umapathy, D., Breit, A., Villeneuve, L.-R., ... Hébert, T. E. (2002). $\beta 1/\beta 2$ -Adrenergic Receptor Heterodimerization Regulates $\beta 2$ -Adrenergic Receptor Internalization and ERK Signaling Efficacy*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(38), 35402–35410. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.M204163200>
- Lee, D.-H., Geyer, E., Flach, A.-C., Jung, K., Gold, R., Flügel, A., ... Lühder, F. (2012). Central nervous system rather than immune cell-derived BDNF mediates axonal protective effects early in autoimmune demyelination. *Acta Neuropathologica*, 123(2), 247–258.
<https://doi.org/10.1007/s00401-011-0890-3>
- Lee, H.-S., Chung, H.-J., Lee, H. W., Jeong, L. S., & Lee, S. K. (2011). Suppression of inflammation response by a novel A3 adenosine receptor agonist thio-Cl-IB-MECA through inhibition of Akt and NF- κ B signaling. *Immunobiology*, 216(9), 997–1003.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.imbio.2011.03.008>
- Lee, S. J., & Benveniste, E. N. (1999). Adhesion molecule expression and regulation on cells of the central nervous system. *Journal of Neuroimmunology*, 98(2), 77–88.
[https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(99\)00084-3](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(99)00084-3)
- Lee, S. T., & Venton, B. J. (2018). Regional Variations of Spontaneous, Transient Adenosine Release in Brain Slices. *ACS Chemical Neuroscience*, 9(3), 505–513.
<https://doi.org/10.1021/acschemneuro.7b00280>
- Lee, W. J., Brown, J. A., Kim, H. R., La Joie, R., Cho, H., Lyoo, C. H., ... Seeley, W. W. (2022). Regional A β -tau interactions promote onset and acceleration of Alzheimer's disease tau spreading. *Neuron*, 110(12), 1932–1943.e5.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.03.034>

- Leija-Salazar, M., Bermúdez de León, M., González-Horta, A., & González-Hernández, B. (2020). Arachidonyl-2'-chloroethylamide (ACEA), a synthetic agonist of cannabinoid receptor, increases CB(1)R gene expression and reduces dyskinesias in a rat model of Parkinson's disease. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 194, 172950. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2020.172950>
- Leterrier, C., Lainé, J., Darmon, M., Boudin, H., Rossier, J., & Lenkei, Z. (2006). Constitutive activation drives compartment-selective endocytosis and axonal targeting of type 1 cannabinoid receptors. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(12), 3141–3153. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5437-05.2006>
- Leung, J. C., Travis, B. R., Verlander, J. W., Sandhu, S. K., Yang, S.-G., Zea, A. H., ... Silverstein, D. M. (2002). Expression and developmental regulation of the NMDA receptor subunits in the kidney and cardiovascular system. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 283(4), R964-71. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00629.2001>
- Levin, O. S., & Vasenina, E. E. (2016). [Twenty-five years of the amyloid hypothesis of alzheimer disease: advances, failures and new perspectives]. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova*, 116(6), 3–9. <https://doi.org/10.17116/jnevro2016116623-9>
- Li, P., Rial, D., Canas, P. M., Yoo, J.-H., Li, W., Zhou, X., ... Chen, J.-F. (2015). Optogenetic activation of intracellular adenosine A2A receptor signaling in the hippocampus is sufficient to trigger CREB phosphorylation and impair memory. *Molecular Psychiatry*, 20(11), 1339–1349. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.182>
- Li, S., Geiger, N. H., Soliman, M. L., Hui, L., Geiger, J. D., & Chen, X. (2015). Caffeine, Through Adenosine A3 Receptor-Mediated Actions, Suppresses Amyloid- β Protein Precursor Internalization and Amyloid- β Generation. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 47(1), 73–83. <https://doi.org/10.3233/JAD-142223>
- Li, Y., Li, L., Wu, J., Zhu, Z., Feng, X., Qin, L., ... Yu, Y.-Q. (2020). Activation of astrocytes in hippocampus decreases fear memory through adenosine A(1) receptors. *ELife*, 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.57155>
- Liddel, S. A., & Barres, B. A. (2017). Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity*, 46(6), 957–967. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.006>
- Liddel, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., ... Barres, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, 541(7638), 481–487. <https://doi.org/10.1038/nature21029>
- Lillo, A., Martínez-Pinilla, E., Reyes-Resina, I., Navarro, G., & Franco, R. (2020a). Adenosine a2a and a3 receptors are able to interact with each other. A further piece in the puzzle of adenosine receptor-mediated signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms21145070>
- Lillo, A., Martínez-Pinilla, E., Reyes-Resina, I., Navarro, G., & Franco, R. (2020b). Adenosine A2A and A3 Receptors Are Able to Interact with Each Other. A Further Piece in the Puzzle of Adenosine Receptor-Mediated Signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21145070>
- Lillo, A., Raich, I., Lillo, J., Pérez-Olives, C., Navarro, G., & Franco, R. (2022). Expression of the Adenosine A(2A)-A(3) Receptor Heteromer in Different Brain Regions and Marked Upregulation in the Microglia of the Transgenic APP(Sw,Ind) Alzheimer's

- Disease Model. *Biomedicines*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020214>
- Limbird, L. E., Meyts, P. D., & Lefkowitz, R. J. (1975). Beta-adrenergic receptors: evidence for negative cooperativity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 64(4), 1160–1168. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(75\)90815-3](https://doi.org/10.1016/0006-291x(75)90815-3)
- Lin, T.-H., Yang, R.-S., Tang, C.-H., Wu, M.-Y., & Fu, W.-M. (2008). Regulation of the maturation of osteoblasts and osteoclastogenesis by glutamate. *European Journal of Pharmacology*, 589(1–3), 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.04.060>
- Linker, R. A., Lee, D.-H., Demir, S., Wiese, S., Kruse, N., Siglienti, I., ... Gold, R. (2010). Functional role of brain-derived neurotrophic factor in neuroprotective autoimmunity: therapeutic implications in a model of multiple sclerosis. *Brain : A Journal of Neurology*, 133(Pt 8), 2248–2263. <https://doi.org/10.1093/brain/awq179>
- Little, J. W., Ford, A., Symons-Liguori, A. M., Chen, Z., Janes, K., Doyle, T., ... Salvemini, D. (2015). Endogenous adenosine A3 receptor activation selectively alleviates persistent pain states. *Brain*, 138(1), 28–35. <https://doi.org/10.1093/brain/awu330>
- Liu, G., Zhang, W., Guo, J., Kong, F., Zhou, S., Chen, S., ... Zang, D. (2018). Adenosine binds predominantly to adenosine receptor A1 subtype in astrocytes and mediates an immunosuppressive effect. *Brain Research*, 1700, 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.06.021>
- Liu, J., Zhou, L., Xiong, K., Godlewski, G., Mukhopadhyay, B., Tam, J., ... Kunos, G. (2012). Hepatic cannabinoid receptor-1 mediates diet-induced insulin resistance via inhibition of insulin signaling and clearance in mice. *Gastroenterology*, 142(5), 1218–1228.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.01.032>
- Liu, Q., Bhat, M., Bowen, W. D., & Cheng, J. (2009). Signaling pathways from cannabinoid receptor-1 activation to inhibition of N-methyl-D-aspartic acid mediated calcium influx and neurotoxicity in dorsal root ganglion neurons. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 331(3), 1062–1070. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.156216>
- Liu, Y., Alahiri, M., Ulloa, B., Xie, B., & Sadiq, S. A. (2018). Adenosine A2A receptor agonist ameliorates EAE and correlates with Th1 cytokine-induced blood brain barrier dysfunction via suppression of MLCK signaling pathway. *Immunity, Inflammation and Disease*, 6(1), 72–80. <https://doi.org/10.1002/iid3.187>
- Long, J. Z., Nomura, D. K., & Cravatt, B. F. (2009). Characterization of monoacylglycerol lipase inhibition reveals differences in central and peripheral endocannabinoid metabolism. *Chemistry & Biology*, 16(7), 744–753. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2009.05.009>
- Lopes, C. R., Cunha, R. A., & Agostinho, P. (2021). Astrocytes and Adenosine A(2A) Receptors: Active Players in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience*, 15, 666710. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.666710>
- Loram, L. C., Strand, K. A., Taylor, F. R., Sloane, E., Van Dam, A.-M., Rieger, J., ... Watkins, L. R. (2015). Adenosine 2A receptor agonism: A single intrathecal administration attenuates motor paralysis in experimental autoimmune encephalopathy in rats. *Brain, Behavior, and Immunity*, 46, 50–54. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.01.014>
- Lou, Z.-Y., Cheng, J., Wang, X.-R., Zhao, Y.-F., Gan, J., Zhou, G.-Y., ... Xiao, B.-G. (2018). The inhibition of CB₁ receptor accelerates the onset and development of EAE possibly by regulating microglia/macrophages polarization. *Journal of Neuroimmunology*, 317, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.02.001>

- Louveau, A., Herz, J., Alme, M. N., Salvador, A. F., Dong, M. Q., Viar, K. E., ... Kipnis, J. (2018). CNS lymphatic drainage and neuroinflammation are regulated by meningeal lymphatic vasculature. *Nature Neuroscience*, 21(10), 1380–1391. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0227-9>
- Luan, G., Wang, X., Gao, Q., Guan, Y., Wang, J., Deng, J., ... Li, T. (2017). Upregulation of Neuronal Adenosine A1 Receptor in Human Rasmussen Encephalitis. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 76(8), 720–731. <https://doi.org/10.1093/jnen/nlx053>
- Lublin, F. D., & Reingold, S. C. (1996). Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*, 46(4), 907–911. <https://doi.org/10.1212/wnl.46.4.907>
- Luongo, L., Guida, F., Imperatore, R., Napolitano, F., Gatta, L., Cristino, L., ... Maione, S. (2014). The A1 adenosine receptor as a new player in microglia physiology. *Glia*, 62(1), 122–132. <https://doi.org/10.1002/glia.22592>
- Maccarrone, M. (2017). Metabolism of the Endocannabinoid Anandamide: Open Questions after 25 Years . *Frontiers in Molecular Neuroscience* , Vol. 10. Retrieved from <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2017.00166>
- Machado-Santos, J., Saji, E., Tröscher, A. R., Paunovic, M., Liblau, R., Gabriely, G., ... Lassmann, H. (2018). The compartmentalized inflammatory response in the multiple sclerosis brain is composed of tissue-resident CD8+ T lymphocytes and B cells. *Brain : A Journal of Neurology*, 141(7), 2066–2082. <https://doi.org/10.1093/brain/awy151>
- Mackie, K. (2008). Cannabinoid Receptors: Where They are and What They do. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(s1), 10–14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01671.x>
- Malva, J. O., Silva, A. P., & Cunha, R. A. (2003). Presynaptic modulation controlling neuronal excitability and epileptogenesis: role of kainate, adenosine and neuropeptide Y receptors. *Neurochemical Research*, 28(10), 1501–1515. <https://doi.org/10.1023/a:1025618324593>
- Maneuf, Y. P., & Brothie, J. M. (1997). Paradoxical action of the cannabinoid WIN 55,212-2 in stimulated and basal cyclic AMP accumulation in rat globus pallidus slices. *British Journal of Pharmacology*, 120(8), 1397–1398. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701101>
- Manuel, I., González de San Román, E., Giral, M. T., Ferrer, I., & Rodríguez-Puertas, R. (2014). Type-1 cannabinoid receptor activity during Alzheimer's disease progression. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 42(3), 761–766. <https://doi.org/10.3233/JAD-140492>
- Mao, C., Shen, C., Li, C., Shen, D.-D., Xu, C., Zhang, S., ... Zhang, Y. (2020). Cryo-EM structures of inactive and active GABAB receptor. *Cell Research*, 30(7), 564–573. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0350-5>
- Maresz, K., Pryce, G., Ponomarev, E. D., Marsicano, G., Croxford, J. L., Shriver, L. P., ... Dittel, B. N. (2007). Direct suppression of CNS autoimmune inflammation via the cannabinoid receptor CB1 on neurons and CB2 on autoreactive T cells. *Nature Medicine*, 13(4), 492–497. <https://doi.org/10.1038/nm1561>
- Martí Navia, A., Dal Ben, D., Lambertucci, C., Spinaci, A., Volpini, R., Marques-Morgado, I., ...

- Buccioni, M. (2020). Adenosine Receptors as Neuroinflammation Modulators: Role of A1 Agonists and A2A Antagonists. *Cells*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/cells9071739>
- Masutani, H., Bai, J., Kim, Y.-C., & Yodoi, J. (2004). Thioredoxin as a neurotrophic cofactor and an important regulator of neuroprotection. *Molecular Neurobiology*, 29(3), 229–242. <https://doi.org/10.1385/MN:29:3:229>
- Matthews, P. M. (2019). Chronic inflammation in multiple sclerosis — seeing what was always there. *Nature Reviews Neurology*, 15(10), 582–593. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0240-y>
- Mayne, M., Shepel, P. N., Jiang, Y., Geiger, J. D., & Power, C. (1999). Dysregulation of adenosine A1 receptor-mediated cytokine expression in peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients. *Annals of Neurology*, 45(5), 633–639. [https://doi.org/10.1002/1531-8249\(199905\)45:5<633::AID-ANA12>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1531-8249(199905)45:5<633::AID-ANA12>3.0.CO;2-X)
- Mayo, L., Quintana, F. J., & Weiner, H. L. (2012). The innate immune system in demyelinating disease. *Immunological Reviews*, 248(1), 170–187. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01135.x>
- McDonald, N. A., Henstridge, C. M., Connolly, C. N., & Irving, A. J. (2007). An Essential Role for Constitutive Endocytosis, but Not Activity, in the Axonal Targeting of the CB₁ Cannabinoid Receptor. *Molecular Pharmacology*, 71(4), 976 LP – 984. <https://doi.org/10.1124/mol.106.029348>
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N. E., Schatz, A. R., ... Compton, D. R. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology*, 50(1), 83–90. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(95\)00109-d](https://doi.org/10.1016/0006-2952(95)00109-d)
- Mechoulam, Raphael. (1986). The Pharmacohistory of Cannabis Sativa. In *Cannabinoids As Therapeutic Agents* (1st ed., p. 20).
- Medina-Vera, D., Zhao, H., Berezski, E., Rosell-Valle, C., Shimozaawa, M., Chen, G., ... Tambaro, S. (2023). The Expression of the Endocannabinoid Receptors CB2 and GPR55 Is Highly Increased during the Progression of Alzheimer's Disease in App(NL-G-F) Knock-In Mice. *Biology*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/biology12060805>
- Miller, D. M., Rudick, R. A., Cutter, G., Baier, M., & Fischer, J. S. (2000). Clinical Significance of the Multiple Sclerosis Functional Composite: Relationship to Patient-Reported Quality of Life. *Archives of Neurology*, 57(9), 1319–1324. <https://doi.org/10.1001/archneur.57.9.1319>
- Minghetti, L., Greco, A., Potenza, R. L., Pezzola, A., Blum, D., Bantubungi, K., & Popoli, P. (2007). Effects of the adenosine A2A receptor antagonist SCH 58621 on cyclooxygenase-2 expression, glial activation, and brain-derived neurotrophic factor availability in a rat model of striatal neurodegeneration. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 66(5), 363–371. <https://doi.org/10.1097/nen.0b013e3180517477>
- Ministerio de Sanidad, C. y B. S. (2019). *Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social, Plan integral de Alzheimer y otras demencias (2019-2023)*. Retrieved from https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/docs/Plan_Integral_Alzheimer_Octubre_2019.pdf
- Miron, V. E., Boyd, A., Zhao, J.-W., Yuen, T. J., Ruckh, J. M., Shadrach, J. L., ... Ffrench-Constant, C. (2013). M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte

- differentiation during CNS remyelination. *Nature Neuroscience*, 16(9), 1211–1218.
<https://doi.org/10.1038/nn.3469>
- Mishizen-Eberz, A. J., Rissman, R. A., Carter, T. L., Ikonovic, M. D., Wolfe, B. B., & Armstrong, D. M. (2004). Biochemical and molecular studies of NMDA receptor subunits NR1/2A/2B in hippocampal subregions throughout progression of Alzheimer's disease pathology. *Neurobiology of Disease*, 15(1), 80–92.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2003.09.016>
- Mojsilovic-Petrovic, J., Jeong, G.-B., Crocker, A., Arneja, A., David, S., Russell, D. S., & Kalb, R. G. (2006). Protecting motor neurons from toxic insult by antagonism of adenosine A2a and Trk receptors. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(36), 9250–9263. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1856-06.2006>
- Molina-Holgado, F., Pinteaux, E., Moore, J. D., Molina-Holgado, E., Guaza, C., Gibson, R. M., & Rothwell, N. J. (2003). Endogenous interleukin-1 receptor antagonist mediates anti-inflammatory and neuroprotective actions of cannabinoids in neurons and glia. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(16), 6470–6474. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-16-06470.2003>
- Moore, D., Iritani, S., Chambers, J., & Emson, P. (2000). Immunohistochemical localization of the P2Y1 purinergic receptor in Alzheimer's disease. *NeuroReport*, 11(17). Retrieved from https://journals.lww.com/neuroreport/Fulltext/2000/11270/Immunohistochemical_localization_of_the_P2Y1.41.aspx
- Moreno, E., Chiarlone, A., Medrano, M., Puigdel·l·vol, M., Bibic, L., Howell, L. A., ... Guzmán, M. (2018). Singular Location and Signaling Profile of Adenosine A2A-Cannabinoid CB1 Receptor Heteromers in the Dorsal Striatum. *Neuropsychopharmacology*, 43(5), 964–977. <https://doi.org/10.1038/npp.2017.12>
- Mori, A. (2014). Mode of action of adenosine A2A receptor antagonists as symptomatic treatment for Parkinson's disease. *International Review of Neurobiology*, 119, 87–116. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801022-8.00004-0>
- Moriyoshi, K., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Mizuno, N., & Nakanishi, S. (1991). Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature*, 354(6348), 31–37. <https://doi.org/10.1038/354031a0>
- Mosca, L., Mantero, V., Penco, S., La Mantia, L., De Benedetti, S., Marazzi, M. R., ... Protti, A. (2017). HLA-DRB1*15 association with multiple sclerosis is confirmed in a multigenerational Italian family. *Functional Neurology*, 32(2), 83–88. <https://doi.org/10.11138/fneur/2017.32.2.083>
- Motl, R. W., & Pilutti, L. A. (2012). The benefits of exercise training in multiple sclerosis. *Nature Reviews. Neurology*, 8(9), 487–497. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.136>
- Munger, K. L., Levin, L. I., Hollis, B. W., Howard, N. S., & Ascherio, A. (2006). Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA*, 296(23), 2832–2838. <https://doi.org/10.1001/jama.296.23.2832>
- Nadal, X., Del Río, C., Casano, S., Palomares, B., Ferreiro-Vera, C., Navarrete, C., ... Muñoz, E. (2017). Tetrahydrocannabinolic acid is a potent PPARγ agonist with neuroprotective activity. *British Journal of Pharmacology*, 174(23), 4263–4276. <https://doi.org/10.1111/bph.14019>

- Naor, Z. (2009). Signaling by G-protein-coupled receptor (GPCR): Studies on the GnRH receptor. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 30(1), 10–29.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2008.07.001>
- Navarro, G., Borroto-Escuela, D., Angelats, E., Etayo, Í., Reyes-Resina, I., Pulido-Salgado, M., ... Franco, R. (2018). Receptor-heteromer mediated regulation of endocannabinoid signaling in activated microglia. Role of CB1 and CB2 receptors and relevance for Alzheimer's disease and levodopa-induced dyskinesia. *Brain, Behavior, and Immunity*, 67, 139–151. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.08.015>
- Navarro, G., Carriba, P., Gandía, J., Ciruela, F., Casadó, V., Cortés, A., ... Franco, R. (2008). Detection of heteromers formed by cannabinoid CB1, dopamine D2, and adenosine A2A G-protein-coupled receptors by combining bimolecular fluorescence complementation and bioluminescence energy transfer. *TheScientificWorldJournal*, 8, 1088–1097. <https://doi.org/10.1100/tsw.2008.136>
- Navarro, G., Cordoní, A., Brugarolas, M., Moreno, E., Aguinaga, D., Pérez-Benito, L., ... Franco, R. (2018). Cross-communication between Gi and Gs in a G-protein-coupled receptor heterotetramer guided by a receptor C-terminal domain. *BMC Biology*, 16(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0491-x>
- Navarro, G., Cordoní, A., Zelman-Femiak, M., Brugarolas, M., Moreno, E., Aguinaga, D., ... Franco, R. (2016). Quaternary structure of a G-protein-coupled receptor heterotetramer in complex with Gi and Gs. *BMC Biology*, 14(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s12915-016-0247-4>
- Navarro, G., Gonzalez, A., Campanacci, S., Rivas-Santisteban, R., Reyes-Resina, I., Casajuana-Martin, N., ... Franco, R. (2020). Experimental and computational analysis of biased agonism on full-length and a C-terminally truncated adenosine A2A receptor. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 2723–2732. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.09.028>
- Navarro, G., Gonzalez, A., Sánchez-Morales, A., Casajuana-Martin, N., Gómez-Ventura, M., Cordoní, A., ... Franco, R. (2021). Design of Negative and Positive Allosteric Modulators of the Cannabinoid CB2 Receptor Derived from the Natural Product Cannabidiol. *Journal of Medicinal Chemistry*, 64(13), 9354–9364. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00561>
- Navinci diagnostics. (2023). Naveni Triflex.
- Newton, W. (2022). Alzheimer's disease: major drug trial results to watch in 2022 and beyond. Retrieved from Clinical Trials Arena website:
<https://www.clinicaltrialsarena.com/features/alzheimers-disease-clinical-trials/>
- Ng, G. Y., Mouillac, B., George, S. R., Caron, M., Dennis, M., Bouvier, M., & O'Dowd, B. F. (1994). Desensitization, phosphorylation and palmitoylation of the human dopamine D1 receptor. *European Journal of Pharmacology*, 267(1), 7–19. [https://doi.org/10.1016/0922-4106\(94\)90219-4](https://doi.org/10.1016/0922-4106(94)90219-4)
- Nguyen, P. T., Schmid, C. L., Raehal, K. M., Selley, D. E., Bohn, L. M., & Sim-Selley, L. J. (2012). β -arrestin2 regulates cannabinoid CB1 receptor signaling and adaptation in a central nervous system region-dependent manner. *Biological Psychiatry*, 71(8), 714–724. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.11.027>
- Niu, H., Álvarez-Álvarez, I., Guillén-Grima, F., & Aguinaga-Ontoso, I. (2017). Prevalencia e incidencia de la enfermedad de Alzheimer en Europa: metaanálisis. *Neurología*, 32(8), 523–532. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2016.02.016>

- Núñez, F., Taura, J., Camacho, J., López-Cano, M., Fernández-Dueñas, V., Castro, N., ... Ciruela, F. (2018). PBF509, an Adenosine A(2A) Receptor Antagonist With Efficacy in Rodent Models of Movement Disorders. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1200. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01200>
- O'Brien, R. J., & Wong, P. C. (2011). Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annual Review of Neuroscience*, 34, 185–204. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113613>
- Obrietan, K., Belousov, A. B., Heller, H. C., & van den Pol, A. N. (1995). Adenosine pre- and postsynaptic modulation of glutamate-dependent calcium activity in hypothalamic neurons. *Journal of Neurophysiology*, 74(5), 2150–2162. <https://doi.org/10.1152/jn.1995.74.5.2150>
- Ochaion, A., Bar-Yehuda, S., Cohen, S., Barer, F., Patoka, R., Amital, H., ... Fishman, P. (2009). The anti-inflammatory target A3 adenosine receptor is over-expressed in rheumatoid arthritis, psoriasis and Crohn's disease. *Cellular Immunology*, 258(2), 115–122. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2009.03.020>
- Ohta, A., & Sitkovsky, M. (2009). The adenosinergic immunomodulatory drugs. *Current Opinion in Pharmacology*, 9(4), 501–506. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.05.005>
- Oláh, A., Markovics, A., Szabó-Papp, J., Szabó, P. T., Stott, C., Zouboulis, C. C., & Bíró, T. (2016). Differential effectiveness of selected non-psychotropic phytocannabinoids on human sebocyte functions implicates their introduction in dry/seborrheic skin and acne treatment. *Experimental Dermatology*, 25(9), 701–707. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/exd.13042>
- Orr, A. G., Hsiao, E. C., Wang, M. M., Ho, K., Kim, D. H., Wang, X., ... Mucke, L. (2015). Astrocytic adenosine receptor A2A and Gs-coupled signaling regulate memory. *Nature Neuroscience*, 18(3), 423–434. <https://doi.org/10.1038/nn.3930>
- Outen, J. D., Burhanullah, M. H., Vandrey, R., Amjad, H., Harper, D. G., Patrick, R. E., ... Rosenberg, P. B. (2021). Cannabinoids for Agitation in Alzheimer's Disease. *The American Journal of Geriatric Psychiatry: Official Journal of the American Association for Geriatric Psychiatry*, 29(12), 1253–1263. <https://doi.org/10.1016/j.jagp.2021.01.015>
- Pagano, E., Romano, B., Iannotti, F. A., Parisi, O. A., D'Armiento, M., Pignatiello, S., ... Borrelli, F. (2019). The non-euphoric phytocannabinoid cannabidivarin counteracts intestinal inflammation in mice and cytokine expression in biopsies from UC pediatric patients. *Pharmacological Research*, 149, 104464. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104464>
- Pagotto, U., Cervino, C., Vicennati, V., Marsicano, G., Lutz, B., & Pasquali, R. (2006). How many sites of action for endocannabinoids to control energy metabolism? *International Journal of Obesity*, 30(1), S39–S43. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803277>
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., ... Miyano, M. (2000). Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor. *Science*, 289(5480), 739–745. <https://doi.org/10.1126/science.289.5480.739>
- PANTHER, E., IDZKO, M., HEROUY, Y., RHEINEN, H., GEBICKE-HAERTER, P. J., MROWIETZ, U., ... NORGAUER, J. (2001). Expression and function of adenosine receptors in human dendritic cells. *The FASEB Journal*, 15(11), 1963–1970. <https://doi.org/https://doi.org/10.1096/fj.01-0169com>

- Park, A.-M., Omura, S., Fujita, M., Sato, F., & Tsunoda, I. (2017). Helicobacter pylori and gut microbiota in multiple sclerosis versus Alzheimer's disease: 10 pitfalls of microbiome studies. *Clinical & Experimental Neuroimmunology*, 8(3), 215–232. <https://doi.org/10.1111/cen3.12401>
- Parsons, M. P., & Raymond, L. A. (2014). Extrasynaptic NMDA receptor involvement in central nervous system disorders. *Neuron*, 82(2), 279–293. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.03.030>
- Pasquini, S., Vincenzi, F., Casetta, I., Laudisi, M., Merighi, S., Gessi, S., ... Varani, K. (2020). Adenosinergic System Involvement in Ischemic Stroke Patients' Lymphocytes. *Cells*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/cells9051072>
- Patel, S., Wohlfeil, E. R., Rademacher, D. J., Carrier, E. J., Perry, L. J., Kundu, A., ... Hillard, C. J. (2003). The general anesthetic propofol increases brain N-arachidonylethanolamine (anandamide) content and inhibits fatty acid amide hydrolase. *British Journal of Pharmacology*, 139(5), 1005–1013. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705334>
- Patricio-Martínez, A., Sánchez-Zavaleta, R., Angulo-Cruz, I., Gutierrez-Praxedis, L., Ramírez, E., Martínez-García, I., & Limón, I. D. (2019). The Acute Activation of the CB1 Receptor in the Hippocampus Decreases Neurotoxicity and Prevents Spatial Memory Impairment in Rats Lesioned with β -Amyloid 25-35. *Neuroscience*, 416, 239–254. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.08.001>
- Patsenker, E., Sachse, P., Chicca, A., Gachet, M. S., Schneider, V., Mattsson, J., ... Semmo, N. (2015). Elevated levels of endocannabinoids in chronic hepatitis C may modulate cellular immune response and hepatic stellate cell activation. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(4), 7057–7076. <https://doi.org/10.3390/ijms16047057>
- Peart, J. N., & Headrick, J. P. (2007). Adenosinergic cardioprotection: Multiple receptors, multiple pathways. *Pharmacology & Therapeutics*, 114(2), 208–221. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.02.004>
- Pereira, G. S., Rossato, J. I., Sarkis, J. J. F., Cammarota, M., Bonan, C. D., & Izquierdo, I. (2005). Activation of adenosine receptors in the posterior cingulate cortex impairs memory retrieval in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, 83(3), 217–223. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2004.12.002>
- Pertwee, R. G. (2008). The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin. *British Journal of Pharmacology*, 153(2), 199–215. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707442>
- Pertwee, Roger G. (2005). Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors. *Life Sciences*, 76(12), 1307–1324. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.10.025>
- Pham, H., Ramp, A. A., Klonis, N., Ng, S. W., Klopstein, A., Ayers, M. M., & Orian, J. M. (2009). The astrocytic response in early experimental autoimmune encephalomyelitis occurs across both the grey and white matter compartments. *Journal of Neuroimmunology*, 208(1–2), 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.12.010>
- Pinna, A., Serra, M., Morelli, M., & Simola, N. (2018). Role of adenosine A2A receptors in motor control: relevance to Parkinson's disease and dyskinesia. *Journal of Neural Transmission*, 125(8), 1273–1286. <https://doi.org/10.1007/s00702-018-1848-6>
- Pitt, D., Werner, P., & Raine, C. S. (2000). Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nature Medicine*, 6(1), 67–70. <https://doi.org/10.1038/71555>

- Pluta, R., Miziak, B., & Czuczwar, S. J. (2023). Apitherapy in Post-Ischemic Brain Neurodegeneration of Alzheimer's Disease Proteinopathy: Focus on Honey and Its Flavonoids and Phenolic Acids. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(15). <https://doi.org/10.3390/molecules28155624>
- Ponath, G., Park, C., & Pitt, D. (2018). The Role of Astrocytes in Multiple Sclerosis. *Frontiers in Immunology*, 9, 217. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00217>
- Presslauer, S., Milosavljevic, D., Brücke, T., Bayer, P., & Hübl, W. (2008). Elevated levels of kappa free light chains in CSF support the diagnosis of multiple sclerosis. *Journal of Neurology*, 255(10), 1508–1514. <https://doi.org/10.1007/s00415-008-0954-z>
- Qureshi, A. R., Rana, A. Q., Malik, S. H., Rizvi, S. F. H., Akhter, S., Vannabouathong, C., ... Rana, R. (2018). Comprehensive Examination of Therapies for Pain in Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neuroepidemiology*, 51(3–4), 190–206. <https://doi.org/10.1159/000492221>
- Radwan, M. M., Chandra, S., Gul, S., & ElSohly, M. A. (2021). Cannabinoids, Phenolics, Terpenes and Alkaloids of Cannabis. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(9). <https://doi.org/10.3390/molecules26092774>
- Raker, V. K., Becker, C., & Steinbrink, K. (2016). The cAMP Pathway as Therapeutic Target in Autoimmune and Inflammatory Diseases. *Frontiers in Immunology*, Vol. 7. Retrieved from <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2016.00123>
- Ramesh, A., Schubert, R. D., Greenfield, A. L., Dandekar, R., Loudermilk, R., Sabatino, J. J. J., ... Wilson, M. R. (2020). A pathogenic and clonally expanded B cell transcriptome in active multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(37), 22932–22943. <https://doi.org/10.1073/pnas.2008523117>
- Rammes, G., Hasenjaeger, A., Sroka-Saidi, K., Deussing, J. M., & Parsons, C. G. (2011). Therapeutic significance of NR2B-containing NMDA receptors and mGluR5 metabotropic glutamate receptors in mediating the synaptotoxic effects of β -amyloid oligomers on long-term potentiation (LTP) in murine hippocampal slices. *Neuropharmacology*, 60(6), 982–990. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.01.051>
- Ransohoff, R. M., & Brown, M. A. (2012). Innate immunity in the central nervous system. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(4), 1164–1171. <https://doi.org/10.1172/JCI58644>
- Rao, V. S., Srinivas, K., Sujini, G. N., & Kumar, G. N. S. (2014). Protein-protein interaction detection: methods and analysis. *International Journal of Proteomics*, 2014, 147648. <https://doi.org/10.1155/2014/147648>
- Raykova, D., Kermatsou, D., Malmqvist, T., Harrison, P. J., Sander, M. R., Stiller, C., ... Söderberg, O. (2022). A method for Boolean analysis of protein interactions at a molecular level. *Nature Communications*, 13(1), 4755. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32395-w>
- Rebola, N., Coelho, J. E., Costenla, A. R., Lopes, L. V., Parada, A., Oliveira, C. R., ... Cunha, R. A. (2003). Decrease of adenosine A1 receptor density and of adenosine neuromodulation in the hippocampus of kindled rats. *The European Journal of Neuroscience*, 18(4), 820–828. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02815.x>
- Reyes-Resina, I., Navarro, G., Aguinaga, D., Canela, E. I., Schoeder, C. T., Załuski, M., ... Franco, R. (2018). Molecular and functional interaction between GPR18 and

- cannabinoid CB2 G-protein-coupled receptors. Relevance in neurodegenerative diseases. *Biochemical Pharmacology*, 157, 169–179.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.06.001>
- Reynolds, R., Roncaroli, F., Nicholas, R., Radotra, B., Gveric, D., & Howell, O. (2011). The neuropathological basis of clinical progression in multiple sclerosis. *Acta Neuropathologica*, 122(2), 155–170. <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0840-0>
- Riccio, P., & Rossano, R. (2015). Nutrition facts in multiple sclerosis. *ASN Neuro*, 7(1).
<https://doi.org/10.1177/1759091414568185>
- Riedel, G., Platt, B., & Micheau, J. (2003). Glutamate receptor function in learning and memory. *Behavioural Brain Research*, 140(1–2), 1–47.
[https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(02\)00272-3](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(02)00272-3)
- Rivas-Santisteban, R., Lillo, A., Lillo, J., Rebassa, J.-B., Contestí, J. S., Saura, C. A., ... Navarro, G. (2021). N-Methyl-D-aspartate (NMDA) and cannabinoid CB(2) receptors form functional complexes in cells of the central nervous system: insights into the therapeutic potential of neuronal and microglial NMDA receptors. *Alzheimer's Research & Therapy*, 13(1), 184. <https://doi.org/10.1186/s13195-021-00920-6>
- Rivera-Oliver, M., Moreno, E., Álvarez-Bagnarol, Y., Ayala-Santiago, C., Cruz-Reyes, N., Molina-Castro, G. C., ... Díaz-Ríos, M. (2019). Adenosine A1-Dopamine D1 Receptor Heteromers Control the Excitability of the Spinal Motoneuron. *Molecular Neurobiology*, 56(2), 797–811. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1120-y>
- Roche, K. W., Standley, S., McCallum, J., Dune Ly, C., Ehlers, M. D., & Wenthold, R. J. (2001). Molecular determinants of NMDA receptor internalization. *Nature Neuroscience*, 4(8), 794–802. <https://doi.org/10.1038/90498>
- Rodríguez-Ruiz, M., Moreno, E., Moreno-Delgado, D., Navarro, G., Mallol, J., Cortés, A., ... Franco, R. (2017). Heteroreceptor Complexes Formed by Dopamine D(1), Histamine H(3), and N-Methyl-D-Aspartate Glutamate Receptors as Targets to Prevent Neuronal Death in Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology*, 54(6), 4537–4550.
<https://doi.org/10.1007/s12035-016-9995-y>
- Rojo-Bustamante, E., Abellanas, M. A., Clavero, P., Thiolat, M.-L., Li, Q., Luquin, M. R., ... Aymerich, M. S. (2018). The expression of cannabinoid type 1 receptor and 2-arachidonoyl glycerol synthesizing/degrading enzymes is altered in basal ganglia during the active phase of levodopa-induced dyskinesia. *Neurobiology of Disease*, 118, 64–75. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.06.019>
- Romero-Fernandez, W., Taura, J. J., Crans, R. A. J., Lopez-Cano, M., Fores-Pons, R., Narváez, M., ... Borroto-Escuela, D. O. (2022). The mGlu5 Receptor Protomer-Mediated Dopamine D2 Receptor Trans-Inhibition Is Dependent on the Adenosine A2A Receptor Protomer: Implications for Parkinson's Disease. *Molecular Neurobiology*, 59(10), 5955–5969. <https://doi.org/10.1007/s12035-022-02946-9>
- Rosim, F. E., Persike, D. S., Nehlig, A., Amorim, R. P., de Oliveira, D. M., & Fernandes, M. J. da S. (2011). Differential neuroprotection by A(1) receptor activation and A(2A) receptor inhibition following pilocarpine-induced status epilepticus. *Epilepsy & Behavior: E&B*, 22(2), 207–213. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2011.07.004>
- Rubio-Perez, J. M., & Morillas-Ruiz, J. M. (2012). A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *TheScientificWorldJournal*, 2012, 756357.
<https://doi.org/10.1100/2012/756357>
- Rueda, D., Galve-Roperh, I., Haro, A., & Guzmán, M. (2000). The CB(1) cannabinoid

- receptor is coupled to the activation of c-Jun N-terminal kinase. *Molecular Pharmacology*, 58(4), 814–820. <https://doi.org/10.1124/mol.58.4.814>
- Ruiz-Calvo, A., Bajo-Grañeras, R., Maroto, I. B., Zian, D., Grabner, G. F., García-Taboada, E., ... Guzmán, M. (2019). Astroglial monoacylglycerol lipase controls mutant huntingtin-induced damage of striatal neurons. *Neuropharmacology*, 150, 134–144. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.03.027>
- Saadeh, R. S., Bryant, S. C., McKeon, A., Weinshenker, B., Murray, D. L., Pittock, S. J., & Willrich, M. A. V. (2022). CSF Kappa Free Light Chains: Cutoff Validation for Diagnosing Multiple Sclerosis. *Mayo Clinic Proceedings*, 97(4), 738–751. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2021.09.014>
- Safo, P. K., Cravatt, B. F., & Regehr, W. G. (2006). Retrograde endocannabinoid signaling in the cerebellar cortex. *Cerebellum (London, England)*, 5(2), 134–145. <https://doi.org/10.1080/14734220600791477>
- Saksida, T., Koprivica, I., Vujičić, M., Stošić-Grujičić, S., Perović, M., Kanazir, S., & Stojanović, I. (2018). Impaired IL-17 Production in Gut-Residing Immune Cells of 5xFAD Mice with Alzheimer's Disease Pathology. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 61(2), 619–630. <https://doi.org/10.3233/JAD-170538>
- Sánchez-Blázquez, P., Rodríguez-Muñoz, M., Vicente-Sánchez, A., & Garzón, J. (2013). Cannabinoid Receptors Couple to NMDA Receptors to Reduce the Production of NO and the Mobilization of Zinc Induced by Glutamate. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(15), 1766–1782. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5100>
- Sarasola, L. I., Del Torrent, C. L., Pérez-Arévalo, A., Argerich, J., Casajuana-Martín, N., Cheigné, A., ... Ciruela, F. (2022). The ADORA1 mutation linked to early-onset Parkinson's disease alters adenosine A(1)-A(2A) receptor heteromer formation and function. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 156, 113896. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113896>
- Schaefer, C., Enning, F., Mueller, J. K., Bumb, J. M., Rohleder, C., Odorfer, T. M., ... Leweke, F. M. (2014). Fatty acid ethanolamide levels are altered in borderline personality and complex posttraumatic stress disorders. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 264(5), 459–463. <https://doi.org/10.1007/s00406-013-0470-8>
- Scheerer, P., Park, J. H., Hildebrand, P. W., Kim, Y. J., Krauß, N., Choe, H.-W., ... Ernst, O. P. (2008). Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature*, 455(7212), 497–502. <https://doi.org/10.1038/nature07330>
- Schiöth, H. B., & Fredriksson, R. (2005). The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *General and Comparative Endocrinology*, 142(1), 94–101. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2004.12.018>
- Schubert, D., Kepchia, D., Liang, Z., Dargusch, R., Goldberg, J., & Maher, P. (2019). Efficacy of Cannabinoids in a Pre-Clinical Drug-Screening Platform for Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology*, 56(11), 7719–7730. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1637-8>
- Schumacher, M., Hussain, R., Gago, N., Oudinet, J.-P., Mattern, C., & Ghoumari, A. M. (2012). Progesterone synthesis in the nervous system: implications for myelination and myelin repair. *Frontiers in Neuroscience*, 6, 10. <https://doi.org/10.3389/fnins.2012.00010>
- Schwienbacher, I., Fendt, M., Hauber, W., & Koch, M. (2002). Dopamine D1 receptors and

- adenosine A1 receptors in the rat nucleus accumbens regulate motor activity but not prepulse inhibition. *European Journal of Pharmacology*, 444(3), 161–169.
[https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(02\)01622-9](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(02)01622-9)
- Seifert, R., & Wenzel-Seifert, K. (2002). Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 366(5), 381–416.
<https://doi.org/10.1007/s00210-002-0588-0>
- Shen, S., Zhao, C., Wu, C., Sun, S., Li, Z., Yan, W., & Shao, Z. (2023). Allosteric modulation of G protein-coupled receptor signaling. *Frontiers in Endocrinology*, 14, 1137604.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1137604>
- Sheth, S., Brito, R., Mukherjea, D., Rybak, L. P., & Ramkumar, V. (2014). Adenosine Receptors: Expression, Function and Regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 15, pp. 2024–2052. <https://doi.org/10.3390/ijms15022024>
- Shonberg, J., Scammells, P. J., & Capuano, B. (2011). Design Strategies for Bivalent Ligands Targeting GPCRs. *ChemMedChem*, 6(6), 963–974.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cmdc.201100101>
- Silva, A. C., Lemos, C., Gonçalves, F. Q., Pliássova, A. V, Machado, N. J., Silva, H. B., ... Agostinho, P. (2018). Blockade of adenosine A(2A) receptors recovers early deficits of memory and plasticity in the triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, 117, 72–81.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.05.024>
- Sitkovsky, M. V, Lukashev, D., Apasov, S., Kojima, H., Koshiba, M., Caldwell, C., ... Thiel, M. (2004). Physiological Control of Immune Response and Inflammatory Tissue Damage by Hypoxia-Inducible Factors and Adenosine A2A Receptors. *Annual Review of Immunology*, 22(1), 657–682.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104731>
- Skipuletz, T., Hackstette, D., Bauer, K., Gudi, V., Pul, R., Voss, E., ... Stangel, M. (2013). Astrocytes regulate myelin clearance through recruitment of microglia during cuprizone-induced demyelination. *Brain : A Journal of Neurology*, 136(Pt 1), 147–167.
<https://doi.org/10.1093/brain/aws262>
- Slomowitz, L. A., Gabbai, F. B., Khang, S. J., Satriano, J., Thareau, S., Deng, A., ... Munger, K. A. (2004). Protein intake regulates the vasodilatory function of the kidney and NMDA receptor expression. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 287(5), R1184-9.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00169.2003>
- Smith, T., Groom, A., Zhu, B., & Turski, L. (2000). Autoimmune encephalomyelitis ameliorated by AMPA antagonists. *Nature Medicine*, 6(1), 62–66.
<https://doi.org/10.1038/71548>
- Smrcka, A. V. (2008). G protein $\beta\gamma$ subunits: Central mediators of G protein-coupled receptor signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(14), 2191–2214.
<https://doi.org/10.1007/s00018-008-8006-5>
- Snyder, E. M., Nong, Y., Almeida, C. G., Paul, S., Moran, T., Choi, E. Y., ... Greengard, P. (2005). Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nature Neuroscience*, 8(8), 1051–1058. <https://doi.org/10.1038/nn1503>
- Sofroniew, M. V, & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1), 7–35. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>

- Song, S., Cong, W., Zhou, S., Shi, Y., Dai, W., Zhang, H., ... Zhang, Q. (2019). Small GTPases: Structure, biological function and its interaction with nanoparticles. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(1), 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2018.06.004>
- Song, X., Zhang, Y., Zhang, L., Song, W., & Shi, L. (2018). Hypoxia enhances indoleamine 2,3-dioxygenase production in dendritic cells. *Oncotarget*, 9(14), 11572–11580. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24098>
- Spagnolo, P. A., Ramchandani, V. A., Schwandt, M. L., Kwako, L. E., George, D. T., Mayo, L. M., ... Heilig, M. (2016). FAAH Gene Variation Moderates Stress Response and Symptom Severity in Patients with Posttraumatic Stress Disorder and Comorbid Alcohol Dependence. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 40(11), 2426–2434. <https://doi.org/10.1111/acer.13210>
- Spence, R. D., Wisdom, A. J., Cao, Y., Hill, H. M., Mongerson, C. R. L., Stapornkul, B., ... Voskuhl, R. R. (2013). Estrogen mediates neuroprotection and anti-inflammatory effects during EAE through ER α signaling on astrocytes but not through ER β signaling on astrocytes or neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(26), 10924–10933. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0886-13.2013>
- Srinivasan, R., Sailasuta, N., Hurd, R., Nelson, S., & Pelletier, D. (2005). Evidence of elevated glutamate in multiple sclerosis using magnetic resonance spectroscopy at 3 T. *Brain : A Journal of Neurology*, 128(Pt 5), 1016–1025. <https://doi.org/10.1093/brain/awh467>
- Stine, W. B. J., Dahlgren, K. N., Krafft, G. A., & LaDu, M. J. (2003). In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(13), 11612–11622. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210207200>
- Stockwell, J., Chen, Z., Niazi, M., Nosib, S., & Cayabyab, F. S. (2016). Protein phosphatase role in adenosine A1 receptor-induced AMPA receptor trafficking and rat hippocampal neuronal damage in hypoxia/reperfusion injury. *Neuropharmacology*, 102, 254–265. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.11.018>
- Stockwell, J., Jakova, E., & Cayabyab, F. S. (2017). Adenosine A1 and A2A Receptors in the Brain: Current Research and Their Role in Neurodegeneration. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(4). <https://doi.org/10.3390/molecules22040676>
- Stone, T. W. (2002). Purines and neuroprotection. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 513, 249–280. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0123-7_9
- Suzuki, N., Hajicek, N., & Kozasa, T. (2009). Regulation and Physiological Functions of G12/13-Mediated Signaling Pathways. *Neurosignals*, 17(1), 55–70. <https://doi.org/10.1159/000186690>
- Swarbrick, S., Wragg, N., Ghosh, S., & Stolzing, A. (2019). Systematic Review of miRNA as Biomarkers in Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology*, 56(9), 6156–6167. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1500-y>
- Synowitz, M., Glass, R., Färber, K., Markovic, D., Kronenberg, G., Herrmann, K., ... Kettenmann, H. (2006). A1 Adenosine Receptors in Microglia Control Glioblastoma-Host Interaction. *Cancer Research*, 66(17), 8550–8557. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0365>
- Tahami Monfared, A. A., Byrnes, M. J., White, L. A., & Zhang, Q. (2022). Alzheimer's Disease: Epidemiology and Clinical Progression. *Neurology and Therapy*, 11(2), 553–569.

<https://doi.org/10.1007/s40120-022-00338-8>

- Tanaka, M., Sackett, S., & Zhang, Y. (2020). Endocannabinoid Modulation of Microglial Phenotypes in Neuropathology. *Frontiers in Neurology*, 11, 87. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00087>
- Temido-Ferreira, M., Ferreira, D. G., Batalha, V. L., Marques-Morgado, I., Coelho, J. E., Pereira, P., ... Lopes, L. V. (2020). Age-related shift in LTD is dependent on neuronal adenosine A2A receptors interplay with mGluR5 and NMDA receptors. *Molecular Psychiatry*, 25(8), 1876–1900. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0110-9>
- Terry, R. D., Masliah, E., Salmon, D. P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., ... Katzman, R. (1991). Physical basis of cognitive alterations in alzheimer's disease: Synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Annals of Neurology*, 30(4), 572–580. <https://doi.org/10.1002/ana.410300410>
- Thacker, E. L., Mirzaei, F., & Ascherio, A. (2006). Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: a meta-analysis. *Annals of Neurology*, 59(3), 499–503. <https://doi.org/10.1002/ana.20820>
- Thakur, G. A., Duclos, R. I. J., & Makriyannis, A. (2005). Natural cannabinoids: templates for drug discovery. *Life Sciences*, 78(5), 454–466. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.09.014>
- Thiel, M., Caldwell, C. C., & Sitkovsky, M. V. (2003). The critical role of adenosine A2A receptors in downregulation of inflammation and immunity in the pathogenesis of infectious diseases. *Microbes and Infection*, 5(6), 515–526. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(03\)00068-6](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(03)00068-6)
- Thompson, S. M., Haas, H. L., & Gähwiler, B. H. (1992). Comparison of the actions of adenosine at pre- and postsynaptic receptors in the rat hippocampus in vitro. *The Journal of Physiology*, 451, 347–363. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1992.sp019168>
- Tozzi, M., & Novak, I. (2017). Purinergic Receptors in Adipose Tissue As Potential Targets in Metabolic Disorders. *Frontiers in Pharmacology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00878>
- Traboulsee, A., Simon, J. H., Stone, L., Fisher, E., Jones, D. E., Malhotra, A., ... Li, D. (2016). Revised Recommendations of the Consortium of MS Centers Task Force for a Standardized MRI Protocol and Clinical Guidelines for the Diagnosis and Follow-Up of Multiple Sclerosis. *American Journal of Neuroradiology*, 37(3), 394 LP – 401. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A4539>
- Traugott, U. (1987). Multiple sclerosis: relevance of class I and class II MHC-expressing cells to lesion development. *Journal of Neuroimmunology*, 16(2), 283–302. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(87\)90082-8](https://doi.org/10.1016/0165-5728(87)90082-8)
- Treppiedi, D., Marra, G., Di Muro, G., Catalano, R., Mangili, F., Esposito, E., ... Mantovani, G. (2022). Dimerization of GPCRs: Novel insight into the role of FLNA and SSAs regulating SST(2) and SST(5) homo- and hetero-dimer formation. *Frontiers in Endocrinology*, 13, 892668. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.892668>
- Tsutsui, S., Schnermann, J., Noorbakhsh, F., Henry, S., Yong, V. W., Winston, B. W., ... Power, C. (2004). A1 Adenosine Receptor Upregulation and Activation Attenuates Neuroinflammation and Demyelination in a Model of Multiple Sclerosis. *Journal of Neuroscience*, 24(6), 1521–1529. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4271-03.2004>
- Tsutsui, S., Vergote, D., Shariat, N., Warren, K., Ferguson, S. S. G., & Power, C. (2008a).

- Glucocorticoids regulate innate immunity in a model of multiple sclerosis: reciprocal interactions between the A1 adenosine receptor and beta-arrestin-1 in monocytoid cells. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(3), 786–796. <https://doi.org/10.1096/fj.07-9002com>
- Tsutsui, S., Vergote, D., Shariat, N., Warren, K., Ferguson, S. S. G., & Power, C. (2008b). Glucocorticoids regulate innate immunity in a model of multiple sclerosis: reciprocal interactions between the A1 adenosine receptor and β -arrestin-1 in monocytoid cells. *The FASEB Journal*, 22(3), 786–796. <https://doi.org/10.1096/fj.07-9002com>
- Turcotte, C., Blanchet, M.-R., Laviolette, M., & Flamand, N. (2016). The CB(2) receptor and its role as a regulator of inflammation. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 73(23), 4449–4470. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2300-4>
- United Nations Office on Drugs and Crime. (2022). *World Drug Report 2022*.
- Valdeolivas, S., Navarrete, C., Cantarero, I., Bellido, M. L., Muñoz, E., & Sagredo, O. (2015). Neuroprotective Properties of Cannabigerol in Huntington's Disease: Studies in R6/2 Mice and 3-Nitropropionate-lesioned Mice. *Neurotherapeutics*, 12(1), 185–199. <https://doi.org/10.1007/s13311-014-0304-z>
- van Dyck, C. H., Swanson, C. J., Aisen, P., Bateman, R. J., Chen, C., Gee, M., ... Iwatsubo, T. (2022). Lecanemab in Early Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*, 388(1), 9–21. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2212948>
- Velazhahan, V., Ma, N., Pándy-Szekeres, G., Kooistra, A. J., Lee, Y., Gloriam, D. E., ... Tate, C. G. (2021). Structure of the class D GPCR Ste2 dimer coupled to two G proteins. *Nature*, 589(7840), 148–153. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2994-1>
- Velikova, M., Doncheva, D., & Tashev, R. (2020). Subchronic effects of ligands of cannabinoid receptors on learning and memory processes of olfactory bulbectomized rats. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 80(3), 286–296.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., ... Zhu, X. (2001). The sequence of the human genome. *Science (New York, N.Y.)*, 291(5507), 1304–1351. <https://doi.org/10.1126/science.1058040>
- Viader, A., Blankman, J. L., Zhong, P., Liu, X., Schlosburg, J. E., Joslyn, C. M., ... Cravatt, B. F. (2015). Metabolic Interplay between Astrocytes and Neurons Regulates Endocannabinoid Action. *Cell Reports*, 12(5), 798–808. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.06.075>
- Viana da Silva, S., Haberl, M. G., Zhang, P., Bethge, P., Lemos, C., Gonçalves, N., ... Mulle, C. (2016). Early synaptic deficits in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease involve neuronal adenosine A2A receptors. *Nature Communications*, 7, 11915. <https://doi.org/10.1038/ncomms11915>
- Villaseca, S., Romero, G., Ruiz, M. J., Pérez, C., Leal, J. I., Tovar, L. M., & Torrejón, M. (2022). Gai protein subunit: A step toward understanding its non-canonical mechanisms. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 941870. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.941870>
- Viñals, X., Moreno, E., Lanfumey, L., Cordoní, A., Pastor, A., de La Torre, R., ... Robledo, P. (2015). Cognitive Impairment Induced by Delta9-tetrahydrocannabinol Occurs through Heteromers between Cannabinoid CB1 and Serotonin 5-HT2A Receptors. *PLOS Biology*, 13(7), e1002194. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002194>
- Vincenzi, F., Corciulo, C., Targa, M., Merighi, S., Gessi, S., Casetta, I., ... Varani, K. (2013).

- Multiple sclerosis lymphocytes upregulate A2A adenosine receptors that are antiinflammatory when stimulated. *European Journal of Immunology*, 43(8), 2206–2216. <https://doi.org/10.1002/eji.201343314>
- Vizurraga, A., Adhikari, R., Yeung, J., Yu, M., & Tall, G. G. (2020). Mechanisms of adhesion G protein-coupled receptor activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 295(41), 14065–14083. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.007423>
- Vogler, S., Goedde, R., Mitterski, B., Gold, R., Kroner, A., Koczan, D., ... Ibrahim, S. M. (2005). Association of a common polymorphism in the promoter of UCP2 with susceptibility to multiple sclerosis. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 83(10), 806–811. <https://doi.org/10.1007/s00109-005-0661-5>
- Walsh, D. M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Cullen, W. K., Anwyl, R., Wolfe, M. S., ... Selkoe, D. J. (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*, 416(6880), 535–539. <https://doi.org/10.1038/416535a>
- Walton, C., King, R., Rechtman, L., Kaye, W., Leray, E., Marrie, R. A., ... Baneke, P. (2020). Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 26(14), 1816–1821. <https://doi.org/10.1177/1352458520970841>
- Wang, M., Li, Z., Song, Y., Sun, Q., Deng, L., Lin, Z., ... Guo, W. (2022). Genetic tagging of the adenosine A2A receptor reveals its heterogeneous expression in brain regions. *Frontiers in Neuroanatomy*, 16, 978641. <https://doi.org/10.3389/fnana.2022.978641>
- Wang, R., & Reddy, P. H. (2017). Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 57(4), 1041–1048. <https://doi.org/10.3233/JAD-160763>
- Wang, T., Xi, N., Chen, Y., Shang, X., Hu, Q., Chen, J., & Zheng, R. (2014). Chronic caffeine treatment protects against experimental autoimmune encephalomyelitis in mice: therapeutic window and receptor subtype mechanism. *Neuropharmacology*, 86, 203–211. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.06.029>
- Wang, X.-F., Galaj, E., Bi, G.-H., Zhang, C., He, Y., Zhan, J., ... Xi, Z.-X. (2020). Different receptor mechanisms underlying phytocannabinoid- versus synthetic cannabinoid-induced tetrad effects: Opposite roles of CB1/CB2 versus GPR55 receptors. *British Journal of Pharmacology*, 177(8), 1865–1880. <https://doi.org/10.1111/bph.14958>
- Wang, X., Whalley, B. J., & Stephens, G. J. (2013). The du(2J) mouse model of ataxia and absence epilepsy has deficient cannabinoid CB₁ receptor-mediated signalling. *The Journal of Physiology*, 591(16), 3919–3933. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.244947>
- Wang, Y., Liu, Y., Ito, Y., Hashiguchi, T., Kitajima, I., Yamakuchi, M., ... Maruyama, I. (2001). Simultaneous measurement of anandamide and 2-arachidonoylglycerol by polymyxin B-selective adsorption and subsequent high-performance liquid chromatography analysis: increase in endogenous cannabinoids in the sera of patients with endotoxic shock. *Analytical Biochemistry*, 294(1), 73–82. <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5015>
- Wargent, E. T., Zaibi, M. S., Silvestri, C., Hislop, D. C., Stocker, C. J., Stott, C. G., ... Cawthorne, M. A. (2013). The cannabinoid Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THCV) ameliorates insulin sensitivity in two mouse models of obesity. *Nutrition & Diabetes*, 3(5), e68–e68. <https://doi.org/10.1038/nutd.2013.9>

- Watanabe, A. M., McConnaughey, M. M., Strawbridge, R. A., Fleming, J. W., Jones, L. R., & Besch, H. R. J. (1978). Muscarinic cholinergic receptor modulation of beta-adrenergic receptor affinity for catecholamines. *The Journal of Biological Chemistry*, 253(14), 4833–4836.
- Weber, M. S., & Hemmer, B. (2010). Cooperation of B cells and T cells in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 51, 115–126. https://doi.org/10.1007/400_2009_21
- Wellington, H., Paterson, R. W., Portelius, E., Törnqvist, U., Magdalinou, N., Fox, N. C., ... Zetterberg, H. (2016). Increased CSF neurogranin concentration is specific to Alzheimer disease. *Neurology*, 86(9), 829–835. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002423>
- Wicken, C., Nguyen, J., Karna, R., & Bhargava, P. (2018). Leptomeningeal inflammation in multiple sclerosis: Insights from animal and human studies. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 26, 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2018.09.025>
- Wollner, H. J., Matchett, J. R., Levine, J., & Loewe, S. (1942). Isolation of a Physiologically Active Tetrahydrocannabinol from Cannabis Sativa Resin. *Journal of the American Chemical Society*, 64(1), 26–29. <https://doi.org/10.1021/ja01253a008>
- Wood, T. B., Spivey, W. T. N., & Easterfield, T. H. (1896). XL.—Charas. The resin of Indian hemp. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 69(0), 539–546. <https://doi.org/10.1039/CT8966900539>
- World Health Organization. Division of Data, A. and D. for I., & WHO. (2020). *WHO methods and data sources for life tables 1990-2019*. Geneva.
- Xia, P., Chen, H. V., Zhang, D., & Lipton, S. A. (2010). Memantine preferentially blocks extrasynaptic over synaptic NMDA receptor currents in hippocampal autapses. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(33), 11246–11250. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2488-10.2010>
- Xu, R., & Wang, Q. (2016). Towards understanding brain-gut-microbiome connections in Alzheimer's disease. *BMC Systems Biology*, 10 Suppl 3(Suppl 3), 63. <https://doi.org/10.1186/s12918-016-0307-y>
- Yan, H., Zhang, E., Feng, C., & Zhao, X. (2016). Role of A3 adenosine receptor in diabetic neuropathy. *Journal of Neuroscience Research*, 94(10), 936–946. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jnr.23774>
- Yao, S.-Q., Li, Z.-Z., Huang, Q.-Y., Li, F., Wang, Z.-W., Augusto, E., ... Zheng, R.-Y. (2012). Genetic inactivation of the adenosine A(2A) receptor exacerbates brain damage in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neurochemistry*, 123(1), 100–112. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07807.x>
- Young, A., Ngiow, S. F., Gao, Y., Patch, A.-M., Barkauskas, D. S., Messaoudene, M., ... Smyth, M. J. (2018). A2AR Adenosine Signaling Suppresses Natural Killer Cell Maturation in the Tumor Microenvironment. *Cancer Research*, 78(4), 1003–1016. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-2826>
- Yu, S. P., Jiang, M. Q., Shim, S. S., Pourkhodad, S., & Wei, L. (2023). Extrasynaptic NMDA receptors in acute and chronic excitotoxicity: implications for preventive treatments of ischemic stroke and late-onset Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 18(1), 43. <https://doi.org/10.1186/s13024-023-00636-1>
- Zagaja, M., Haratym-Maj, A., Szewczyk, A., Rola, R., Maj, M., Łuszczki, J. J., & Andres-Mach, M. (2019). Levetiracetam combined with ACEA, highly selective cannabinoid CB1

- receptor agonist changes neurogenesis in mouse brain. *Neuroscience Letters*, 696, 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.12.016>
- Zamberletti, E., Gabaglio, M., Woolley-Roberts, M., Bingham, S., Rubino, T., & Parolaro, D. (2019). Cannabidiol Treatment Ameliorates Autism-Like Behaviors and Restores Hippocampal Endocannabinoid System and Glia Alterations Induced by Prenatal Valproic Acid Exposure in Rats. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, Vol. 13. Retrieved from <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2019.00367>
- Zawarynski, P., Talerico, T., Seeman, P., Lee, S. P., O'Dowd, B. F., & George, S. R. (1998). Dopamine D2 receptor dimers in human and rat brain. *FEBS Letters*, 441(3), 383–386. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)01588-9](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)01588-9)
- Zeinstra, E., Wilczak, N., & De Keyser, J. (2003). Reactive astrocytes in chronic active lesions of multiple sclerosis express co-stimulatory molecules B7-1 and B7-2. *Journal of Neuroimmunology*, 135(1–2), 166–171. [https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(02\)00462-9](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(02)00462-9)
- Zhang, B., Gaiteri, C., Bodea, L.-G., Wang, Z., McElwee, J., Podtelezchnikov, A. A., ... Emilsson, V. (2013). Integrated systems approach identifies genetic nodes and networks in late-onset Alzheimer's disease. *Cell*, 153(3), 707–720. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.030>
- Zhang, D., Zhao, Q., & Wu, B. (2015). Structural Studies of G Protein-Coupled Receptors. *Molecules and Cells*, 38(10), 836–842. <https://doi.org/10.14348/molcells.2015.0263>
- Zhang, J., & Chen, C. (2008). Endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol protects neurons by limiting COX-2 elevation. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(33), 22601–22611. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800524200>
- Zhang, Y., Cao, H., Qiu, X., Xu, D., Chen, Y., Barnes, G. N., ... Cai, X. (2020). Neuroprotective Effects of Adenosine A1 Receptor Signaling on Cognitive Impairment Induced by Chronic Intermittent Hypoxia in Mice. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00202>
- Zhou, Q., Yang, D., Wu, M., Guo, Y., Guo, W., Zhong, L., ... Zhao, S. (2019). Common activation mechanism of class A GPCRs. *ELife*, 8, e50279. <https://doi.org/10.7554/eLife.50279>
- Zoppi, S., Pérez Nievas, B. G., Madrigal, J. L. M., Manzanares, J., Leza, J. C., & García-Bueno, B. (2011). Regulatory role of cannabinoid receptor 1 in stress-induced excitotoxicity and neuroinflammation. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 36(4), 805–818. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.214>
- Zrzavy, T., Machado-Santos, J., Christine, S., Baumgartner, C., Weiner, H. L., Butovsky, O., & Lassmann, H. (2018). Dominant role of microglial and macrophage innate immune responses in human ischemic infarcts. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 28(6), 791–805. <https://doi.org/10.1111/bpa.12583>

