



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Heterómeros de receptores CB₁, CB₂ y GPR55 y su implicación en enfermedades neurodegenerativas y alcoholismo

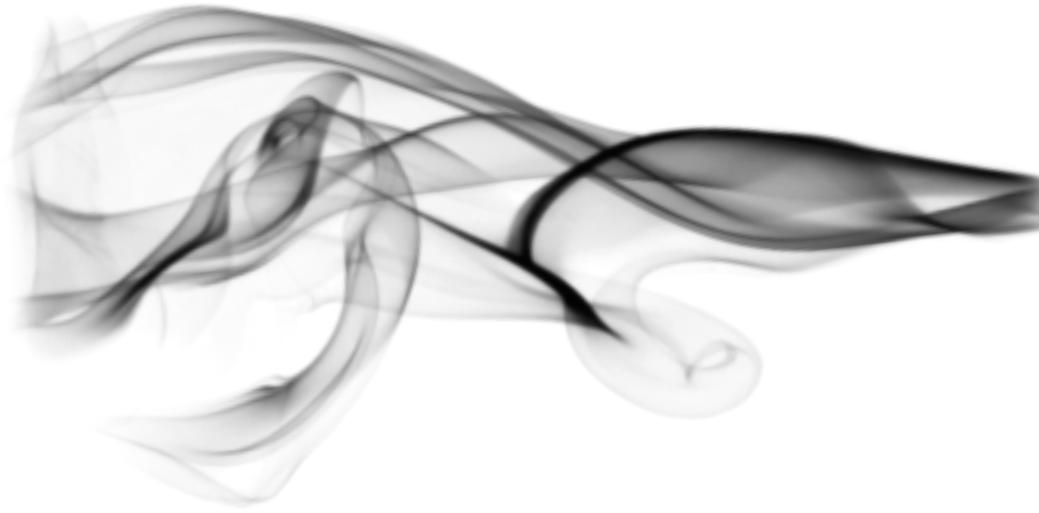
Iñigo Javier Etayo Labiano

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.

HETERÓMEROS DE RECEPTORES CB₁, CB₂ Y GPR55 Y SU
IMPLICACIÓN EN ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS
Y ALCOHOLISMO



Iñigo Javier Etayo Labiano





UNIVERSITAT DE
BARCELONA

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOMEDICINA MOLECULAR

HETERÓMEROS DE RECEPTORES CB₁, CB₂ Y GPR55 Y SU IMPLICACIÓN EN ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS Y ALCOHOLISMO

Memoria presentada por el Graduado en Bioquímica
IÑIGO JAVIER ETAYO LABIANO
para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona

Esta tesis ha sido inscrita dentro del programa de doctorado de Biomedicina del
Departamento de Bioquímica y Biomedicina molecular de la Universidad de Barcelona

El trabajo experimental y la redacción de la presente memoria han sido realizados por
Iñigo Javier Etayo Labiano bajo la dirección del Dr. Rafael Franco Fernández y la Dra.
Gemma Navarro Brugal

Dr. Rafael Franco Fernández

Dra. Gemma Navarro Brugal

Iñigo Javier Etayo Labiano

Barcelona, febrero de 2018

Lo esencial sucede y lo demás es prescindible



Agradecimientos

El apartado de agradecimientos es el más sencillo de escribir en cualquier trabajo. Esto es así porque es fácil darse cuenta de la gente que has tenido a tu lado. En primer lugar, quiero dar las gracias a todos los miembros de mi familia. Familia. Un concepto como este posee un claro valor positivo. Mis padres, Vicente y Blanca, han estado siempre velando por mi bienestar y nunca han dejado de apoyarme. Me han dado todo lo que tengo, y yo soy todo lo que he recibido de ellos. Sin ellos, jamás habría llegado hasta aquí. Mis hermanas, Paula, Angela y Blanca, a pesar de que llevo toda la vida incordiándoles y descabezando placenteramente sus *Barbies*, me han proporcionado todo su cariño y son una pieza fundamental más de la persona que soy hoy. La confianza de mi abuela Inés me ha ayudado en estos cuatro años en Barcelona a superar la distancia que me separa de todos ellos. Gracias a mis difuntos abuelos, Jesús, Blanca y Vicente, que sé que me cuidan desde un lugar mejor que este mundo. También quiero dar las gracias a mis tíos Francis, Fermín, Ana y Mikel y a mis primos, por haberme dado también el cariño que me empuja hacia delante en mi vida cotidiana. Y por supuesto, dentro de mi familia, también quiero darle las gracias a Mentxu, que lleva soportando mi mal carácter durante cuatro años y que me ha levantado del barro cada vez que lo he necesitado. Sin ella no hubiese sido capaz de sobrevivir solo en Barcelona. También quiero darles las gracias a mis suegros, Iñaki y Carmen, y a mi cuñado Iñaki, así como a sus abuelos Victoriano y Carmen, por haberme acogido y cuidado siempre como a un nieto, hijo y hermano.

También quiero darle las gracias a la operación *self-service* al completo (los aludidos lo entienden). Gracias al mamarracho de Javier y a maese Koldovika. Sin los juebirris y las discusiones choras a gritos seríamos como animales y yo estaría un poco más cuerdo. A Berni, a Gabri “el estadístico” y a Rafa “Élber Galarga” / “er cordobeh”, infatigables compañeros de piso y ensuciadores profesionales, mil gracias por aguantar a un tipo como yo. Rafa, a partir de ahora me mandarás croquetas caseras a la dirección que te indique. Al señor Gordejuela y a María Sola, en vuestra boda aprendí el valor de una pierna intacta. Gracias a Leire, Víctor, Eduardo y a los de la secta bioquímica *rules*. Gracias a todos vosotros por esos grandes años en la UNAV y por esas partidas al AGE III y esa basura llamada Imperium III.

Y por supuesto, quiero darles las gracias a todos los miembros de NBR...NBM. Agui, escriba oficial de mi lista negra de ese pequeño reducto del milenarismo reino de Navarra en el laboratorio 4 de NBM, voy a echarte mucho de menos. Los insultos a primera hora de la mañana, los gritos, las miradas de odio, los apuñalamientos a la papelera de reciclaje, las bombas de hielo seco, el efecto sangre de alienígena con acetona y corcho blanco... tú decías que habíamos transformado el laboratorio en un barrio *nigga* y después en Medellín. Yo creo más bien que es lo más parecido a un manicomio en el corazón del mismísimo infierno (el pobre cordobeh sabe bien de lo que hablo). Jasmina, algún día aprenderás el valor de formar una familia y de tener muchos hijos. Se te está

pasando el arroz. Por cierto, gracias por salvarnos el culo a todos en el laboratorio cada día. A Mireia en todas sus versiones (con lo originales que somos para los nombres llegaremos pronto a la versión 3.0). Muchas gracias por soportarme. No hay otra forma de decirlo. Mar, gracias por tus frutos secos y tus galletas. Se que piensas que el principal culpable de que se acaben es Edgard, pero créeme, he ganado peso con ellas. A Irene y sus vestidos PLA, conspiradora primera del reino, es una lástima que nunca más vaya a ver esas épicas batallas entre Edgard y tú por la pipeta multicanal y los kits de AMP. Edgard, que tus valors no te impidan ver el bosque, y que tu velocidad no te impida salir de él (eeeeee, eeeee, eeeee). SalchiPatri, en fin, mi pipeta de 20 microlitros y yo nos acordaremos mucho de ti (liante). Sandra, gracias por creer tanto en mí, he llegado a pensar en fundar una religión alrededor de mi figura. Cristina, he desarrollado una grave y profundada diabetes gracias a ti. Sigue siendo tan adorable y nunca cambies, aunque deberías hacerte mirar tu afición por la Ginebra. Buendi, mucho ánimo con el largo camino que te queda. Verónica, espero que seas realmente feliz con Edu. Antonio, pero ¿qué haces un sábado a las cuatro de la tarde en el laboratorio? y por supuesto, Bote, suerte con tu pequeña. Estoy seguro de que serás un gran padre. Echaré de menos nuestras conversaciones mañaneras sobre cualquier tema.

Por último, pero no por ello menos importante, gracias a Gemma y a Rafa Senior (hay que buscar una forma de identificaros a los dos Rafas). Gracias por vuestra infinita paciencia. Por acogerme en vuestro laboratorio. Por dirigir mi tesis. Por dirigir mi trabajo de final de carrera. Por enseñarme. Por instruirme. Por saber gestionar aquellas situaciones en las que podríais haberme mandado al patíbulo. Se que en el fondo preferiríais un buen jamón de jabugo, en lugar de aparecer mencionados en los típicos agradecimientos de una tesis doctoral, pero...

THAT'S ALL FOLKS!!!

Índice

1. Introducción	17
1.1. Receptores acoplados a proteína G	17
1.1.1. Miscelánea	17
1.1.2. Estructura de los GPCR	17
1.1.3. Clasificación de los GPCR	18
1.1.4. Señalización de los GPCR	19
1.1.5. Control de la señalización de los GPCR	21
1.1.6. Ligandos de los GPCR	22
1.2. El fenómeno de la oligomerización de GPCR	24
1.2.1. Interacción entre receptores	24
1.2.2. Características de la interacción	25
1.2.3. Métodos de estudio de los oligómeros de GPCR	27
1.2.4. Significado funcional de los oligómeros	32
1.3. Receptores de cannabinoides	35
1.3.1. Una larga historia	36
1.3.2. El sistema endocannabinoide	37
1.3.3. Receptor CB ₁	43
1.3.4. Receptor CB ₂	46
1.3.5. Receptor GPR55	47
1.3.6. Otros posibles receptores cannabinoides	51
1.4. Sistema endocannabinoide y neuroinflamación	53
1.5. Sistema endocannabinoide y enfermedades neurodegenerativas	55
1.5.1. Enfermedad de <i>Alzheimer</i>	55
1.5.2. Enfermedad de <i>Parkinson</i>	59
1.5.3. Enfermedad de <i>Huntington</i>	63
1.6. Sistema endocannabinoide y consumo de alcohol	65
1.6.1. Breve historia del consumo de bebidas alcohólicas	65
1.6.2. Consumo de alcohol: Metabolismo, neuroadaptaciones y sistema endocannabinoide	66
2. Objetivos	75
3. Materiales y métodos generales	79
4. Resultados	91
4.1. Regulación de la señalización endocannabinoide mediada por heterómeros de receptores en microglía activada. Papel y relevancia de los receptores CB ₁ y CB ₂ en la enfermedad de <i>Alzheimer</i> y en la discinesia inducida por levodopa	91
4.1.1. Materiales y métodos ¹	91
4.1.2. Resultados experimentales ¹	96

4.2. Efecto <i>in vitro</i> del etanol sobre la señalización de los receptores CB ₂ , GPR55 y el heterómero CB ₂ R/GPR55	109
4.2.1. Materiales y métodos ²	110
4.2.2. Resultados experimentales ²	114
5. Discusión	129
5.1. Regulación de la señalización endocannabinoide mediada por heterómeros de receptores en microglía activada. Papel y relevancia de los receptores CB ₁ y CB ₂ en la enfermedad de <i>Alzheimer</i> y en la discinesia inducida por levodopa	129
5.2. Efecto <i>in vitro</i> del etanol sobre la señalización de los receptores CB ₂ , GPR55 y el heterómero CB ₂ R/GPR55	133
6. Conclusiones	141
7. Bibliografía	145

Abreviaturas

2-AG: 2-Araquidonilglicerol.

2-AGPI: 2-Araquidonil-sn-glicero-3-fosfoinositol.

2-OG: 2-Oleoilglicerol.

3NP: Ácido 3-Nitropropiónico.

5HT_{2A}: Receptor de serotonina 2A.

Å: *Amstrongs*.

A₁AR: Receptor de Adenosina A1.

A₂AR: Receptor de Adenosina A2.

AC: Adenilato ciclasa.

ACTHR: Receptor de Adrenocorticotropina.

EA/AD: Enfermedad de Alzheimer (*Alzheimer's disease*).

ADN/DNA: Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid*).

ADNc/cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario (*Complementary deoxyribonucleic acid*).

AEA: Anandamida.

AFM: Microscopía de fuerza atómica.

AIM: Movimiento involuntario anormal.

AMPc/cAMP: Adenosín monofosfato cíclico (*Cyclic adenosine monophosphate*).

AMT: Transportador de anandamida de membrana.

ARNm/mRNA: Ácido ribonucleico mensajero (*Messenger ribonucleic acid*).

APP: Proteína precursora amiloide (*Amyloid precursor protein*).

AT₁R: Receptor de angiotensina II tipo 1.

ATP: Adenosín trifosfato.

B₂R: Receptor de Bradikinina 2.

BiFC: Complementación bimolecular fluorescente.

BiLC: Complementación bimolecular luminiscente.

BRET: Transferencia de energía por resonancia bioluminiscente.

BSA: Albumina de suero bovino.

CaR: Receptor sensor de calcio.

CB₁R: Receptor de cannabinoides 1.

CB₂R: Receptor de cannabinoides 2.

CBD: Cannabidiol.

CCR₂: Receptor de quimiocinas 2.

CCR₅: Receptor de quimiocinas 5.

CFP: Proteína fluorescente Cian.

CNR1: Gen del Receptor de cannabinoides 1.

CNR2: Gen del Receptor de cannabinoides 1.

Co-IP: co-inmunoprecipitación.

COX-2: Ciclooxygenasa 2.

CRD: Dominio rico en cisteína.

CREB: Elemento de respuesta a cAMP.

CRIP1a/b: Proteína rica en cisteína 1 a/b.

CXCR_{1/2}: Receptor de quimiocinas 1/2.

D₁R: Receptor de dopamina D1.

D₂R: Receptor de dopamina D2.

D₃R: Receptor de dopamina D3.

D₄R: Receptor de dopamina D4.

DAG: Diacilglicerol.

DAGL: Diacilglicerol lipasa.

DMEM: *Dulbecco's Eagle modified medium*.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

ECD: Dominio extracelular.

EL: Loop extracelular.

ERK: Kinasas reguladas por señales extracelulares.

FAAH: Hidrolasa de amidas de ácidos grasos.

FBS: Suero fetal bovino.

FRAP: Recuperación de la fluorescencia tras fotoblanqueo.

FRET: Transferencia de energía por resonancia fluorescente.

GABA: Ácido γ-aminobutírico.

GABA_AR: Receptor GABA_A.

GBR₁: receptor GABA B₁.

GBR₂: Receptor GABA B₂.

GDP: Difosfato de guanosina.

GFP: Proteína fluorescente verde

GHS_{1a}R: Receptor de grelina 1a.

GIP: Proteínas que interactúan con GPCR (*GPCR interacting Proteins*).

GNRHR: Receptor de hormona liberadora de gonadotropina.

GPCR: Receptor acoplado a proteína G (*G-protein-coupled receptor*).

GPR119: Receptor huérfano GPR119

GPR18: Receptor huérfano GPR18.

GPR52: Receptor huérfano GPR52.

GPR53: Receptor huérfano GPR53.

GPR55: Receptor huérfano GPR55.

GRK: kinasas de receptores acoplados a proteína G.

GTP: Trifosfato de guanosina.

HD: Enfermedad de Huntington.

HER₂: Receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano.

HFIP: Hexafluoruro-isopropanol.

HIV-1: Virus de inmunodeficiencia humana 1.

HTT: Huntingtina.

IFM: Inmunofluorescencia.

IFN- γ : Interferón- γ .

IL: Loop intracelular.

IP₃: Inositol 1, 4, 5-trifosfato.

K.O.: *Knock out*.

LOX: Lipooxigenasa.

LPA: Ácido 2-araquidonil lisofosfatídico.

LPI: Lisofosfatidil inositol.

LPS: Lipopolisacárido.

LRP1: Proteína 1 Relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad.

LTP: Potenciación a largo plazo.

M₂R: Receptor muscarínico 2.

M₃R: Receptor muscarínico 3.

MAGL: Monoacilglicerol lipasa.

MAPK: Proteína Kinasas activadas por mitógenos.

mGluR₁: Receptor metabotrópico de glutamato 1.

mGluR₅: Receptor metabotrópico de glutamato 5.

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

MT₁R: Receptor de melatonina 1.

MT₂R: Receptor de melatonina 2.

NAD⁺/H: Dinucleótido de nicotinamida y adenina.

NaGly: N-araquidonil glicina.

NAPE PLD: Fosfolipasa D específica para N-araquidonil fosfatidiletanolamina.

NAPE: N-araquidonil fosfatidiletanolamina.

NAT: N-acil transferasa dependiente de calcio.

NMDAr: Receptor de N-metil-D-aspartato.

NO: Óxido nítrico.

OEA: Oleoiletanolamida.

OX₁R: Receptor de orexina 1.

P2Y₁R: Receptor purinérgico P2Y₁.

PBS: Tampón fosfato salino.

PCA: Ensayo de complementación proteica.

PD: Enfermedad de Parkinson.

PDE: Fosfodiesterasas.

PEI: Polietilenimina.

PI3K: Fosfoinositol 3-Kinasa.

PKA: Proteína kinasa A.

PKC: Proteína kinasa C.

PLA: Ensayo de ligación por proximidad.

PLA₁: Fosfolipasa A₁.

PLC β: fosfolipasa C-β.

PLC: Fosfolipasa C.

PPARγ: Receptor gamma activado por el factor proliferador de peroxisomas.

RE: Retículo endoplasmático.

RET: Resonance Energy transfer.

RGS: Reguladores de la señalización por proteína G.

RhoA: Miembro A de la familia del gen homólogo de Ras.

ROCK: Proteína kinasa asociada a Rho.

TRK: receptor con actividad tirosina kinasa.

SNC: Sistema nervioso central.

SOD1: Superóxido dismutasa 1.

SOD2: Superóxido dismutasa 2.

SRET: Transferencia secuencial de energía por resonancia.

TBS: Solución salina tamponada Tris.

TH: Tirosina hidroxilasa.

THC: Tetrahidrocannabinol.

TIRF: Microscopio de fluorescencia de reflexión interna total.

TM: Transmembrana.

TR-FRET: Transferencia de energía por resonancia fluorescente en tiempo real.

TRPV₁: Receptor de potencial transitorio V₁

TXA₂: Receptor de tromboxano A₂.

V₁R: Receptor de vasopresina 1.

V₂R: Receptor de vasopresina 2.

VFT: *Venus flytrap*.

YFP: Variante amarilla de la proteína fluorescente verde.

β₂-AR: Receptor beta 2 adrenérgico.

λ: Longitud de onda.



INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1. Receptores acoplados a proteínas G

1.1.1. Miscelánea

Los receptores acoplados a proteína G o GPCR son una compleja y versátil superfamilia de proteínas compuesta por más de 1000 miembros distintos y que representa el 3% del proteoma humano (1). Fueron descritos en los años 70 y 80 por Robert J. Lefkowitz y su colega Brian K. Kobilka, dentro de un conjunto de investigaciones sobre el receptor de la hormona Adrenocorticotropa (ACTHR) (2) (3) y los receptores adrenérgicos (4) (5), lo que les valió el premio Nobel de química en el año 2012. Los GPCR están presentes en diversos organismos eucariotas, desde plantas y animales (6) a hongos (7). En el ser humano estos receptores se distribuyen ubicuamente por todo el organismo (8), sin embargo cerca del 90% de los GPCR se expresan en el sistema nervioso central (SNC) (9).

Los GPCR son responsables de la captación de señales extracelulares y de su transducción, desencadenando diversas cascadas de señalización mediadas por múltiples segundos mensajeros, que darán lugar a distintas respuestas celulares. Hormonas, proteínas, lípidos, drogas e incluso fotones pueden actuar como ligandos de los GPCR. Éstos pueden unirse al receptor por su región amino terminal o en bolsillos formados por los dominios transmembrana y extracelulares (10). A día de hoy, cerca del 40 % de los medicamentos presentan como diana terapéutica un GPCR (11). De ahí la relevancia de los estudios sobre estos receptores en el tratamiento de diversas enfermedades, desde el cáncer a patologías del SNC.

1.1.2. Estructura de los GPCR

Los GPCR presentan una estructura típica y reconocible (Figura 1) de siete dominios transmembrana (TM1-TM7), unidos mediante tres bucles extracelulares (EC1, EC2 y EC3) y tres bucles intracelulares (IC1, IC2, IC3). El dominio amino terminal queda orientado hacia el medio extracelular y el dominio carboxilo terminal hacia el citosol. Los dominios transmembrana presentan una elevada hidrofobicidad y la secuencia de aminoácidos que los compone posee una estructura secundaria de tipo hélice alfa (Figura 1) (12) (13). La secuencia de los GPCR presenta motivos altamente conservados en diferentes especies (14), y se cree que proceden de un ancestro común de hace unos 1200 millones de años (15).

Desde la obtención de la estructura cristalina del receptor de rodopsina en el año 2000 mediante difracción de rayos-X (16), se han obtenido más de 100 estructuras cristalinas de estos receptores (17) en diversos estados de activación, unidos a diferentes ligandos o interaccionando con diferentes componentes de la maquinaria intracelular. Conocer la estructura de cada uno de los GPCR permite diseñar nuevos compuestos basados en características propias de cada receptor (18).

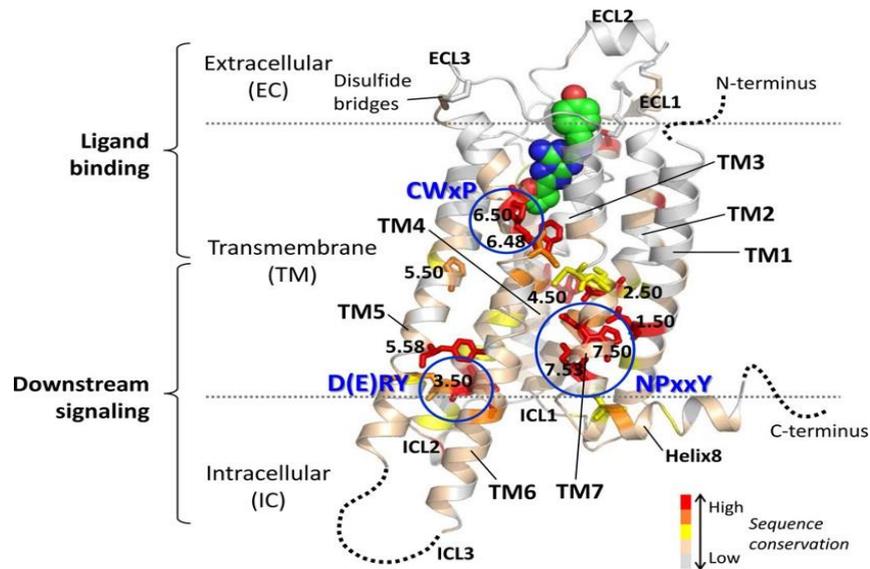


Figura 1. Estructura típica de un GPCR. Se ha utilizado como ejemplo el receptor de Adenosina A_{2A} unido a su propio ligando, representado con esferas de color verde. En colores blanco, amarillo y rojo quedan representadas las secuencias de la estructura con un mayor grado de conservación, siendo el blanco indicador de menor conservación de secuencia y el rojo de alta conservación. Extraído de Lee, Basith, & Choi, 2017 (19).

1.1.3. Clasificación de los GPCR

En las últimas décadas, los GPCR han sido agrupados según diferentes clasificaciones atendiendo a distintos criterios. Según la clasificación propuesta por Kolakowski en 1994 (20), los GPCR se dividen en seis familias diferenciadas (de la familia A hasta la F), atendiendo a su estructura y características genéticas. Los GPCR de la misma familia generalmente presentan una identidad de entorno al 20% en sus dominios transmembrana, y se diferencian principalmente en sus dominios amino terminal. Existen otros sistemas de clasificación de GPCR, como la clasificación GRAFS (*Glutamate, Rhodopsin, Adhesion, Frizzled/Taste2* y *Secretin*), que comprende cinco familias de acuerdo con su filogenia y su evolución a partir de un ancestro común (21).

La familia A o *Rhodopsin-like* es la más numerosa de todas, con distintas subfamilias y con unos 700 miembros diferentes, así como la mejor descrita y de la que existe un mayor número de estructuras cristalinas (22). Sus ligandos pueden ser desde péptidos hasta hormonas e incluso fotones. La estructura de sus componentes presenta un dominio amino terminal extracelular, siete dominios transmembrana con sus respectivos bucles extracelulares e intracelulares, y un dominio carboxilo terminal citosólico. Además, los miembros de esta familia se caracterizan por poseer un motivo NSxxNPxxY en el dominio transmembrana 7 (TM7), un motivo DRY altamente conservado entre los distintos miembros de esta familia situado entre el dominio TM3 y el segundo loop intracelular (IL2), así como un puente disulfuro que une los dominios extracelulares uno y dos (EC1 y EC2) (23).

La familia B o *Secretin family* está formada por 15 receptores de péptidos hormonales (24), que son importantes dianas terapéuticas de una gran variedad de enfermedades como la diabetes, la osteoporosis, el cáncer y alteraciones neurológicas (25). Estructuralmente, los miembros de esta familia presentan un extremo amino terminal

que consta de entre 60 y 80 aminoácidos y que constituye el dominio extracelular (ECD). También poseen siete dominios transmembrana y un extremo carboxilo terminal citosólico. La estructura del ECD varía de un receptor a otro, aunque se caracteriza por presentar una hélice alfa y dos pares de láminas beta antiparalelas, estabilizadas por puentes disulfuro entre cisteínas y por interacciones hidrofóbicas (26).

La familia C consta de 22 miembros diferentes, desde receptores GABA_B a receptores gustativos (27). Estos GPCR presentan una amplia variedad de agonistas como iones o azúcares. Pueden formar dímeros (complejos de dos receptores) constitutivamente, y se caracterizan por la presencia de un dominio extracelular de gran tamaño, de entre 200 y 600 aminoácidos (28), que se encuentra dividido a su vez en dos dominios distintos denominados *Venus flytrap* (VFT) y *Cysteine-rich domain* (CRD) (29).

La familia D está formada por receptores de feromonas y se expresa en levaduras, y la familia E se encuentra involucrada en el desarrollo de *Dictyostelium Discoideum* (30) y está presente en los mohos mucilaginosos. Finalmente, la familia F se compone de receptores de proteínas implicadas en el desarrollo como Wnt, sintetizada durante el desarrollo embrionario y necesaria para la formación de los tejidos del organismo (21).

1.1.4. Señalización de los GPCR

La principal función de los GPCR consiste en la transducción de las señales procedentes del medio extracelular hacia el interior de la célula, hecho que da lugar a la activación de diversas cascadas de señalización que tendrán como resultado distintas respuestas celulares. Estos receptores, como su propio nombre indica, tienen la capacidad de interactuar con las denominadas proteínas G heterotriméricas o *Guanine-nucleotide binding proteins*, acoplado el receptor a los mediadores intracelulares (31). Las proteínas G están compuestas por tres subunidades distintas, denominadas α , β y γ . La subunidad α posee un peso de entre 40 y 45 kDa, mientras que las subunidades β y γ son más pequeñas y pesan alrededor de 37 y 8 kDa respectivamente. En un estado inicial, la proteína G se encuentra unida a GDP. La activación del receptor da lugar a un intercambio de GDP por GTP, actuando como un *guanine nucleotide exchange factor* (GEF), hecho que provoca un cambio conformacional en la proteína heterotrimérica G, separándose la subunidad $G\alpha$ del dímero compuesto por las subunidades β y γ (32).

La subunidad $G\alpha$ posee actividad GTPasa lenta intrínseca, por lo que cataliza una reacción que libera GDP y fosfato inorgánico a partir de GTP (33). Este proceso puede verse facilitado gracias a la actividad de proteínas reguladoras de la señalización por proteínas G (RGS), que son capaces de unirse a $G\alpha$ y acelerar la hidrólisis (34). Este fenómeno inhibe la actividad de la subunidad $G\alpha$ y favorece su unión al dímero $\beta\gamma$, que debido a esto perderá también su actividad (Figura 2). Tanto la subunidad $G\alpha$ como el dímero $\beta\gamma$ tienen la capacidad de señalar cuando se encuentran disociados tras la activación del receptor. En condiciones normales, cuando se encuentran formando parte de la proteína G heterotrimérica, las subunidades carecen de actividad. De esta forma, el ensamblaje de la proteína G favorece la terminación de la señalización del receptor.

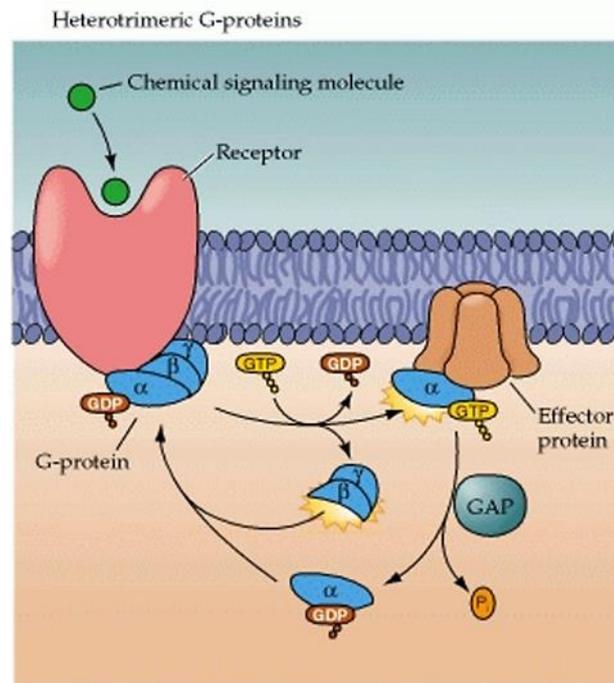
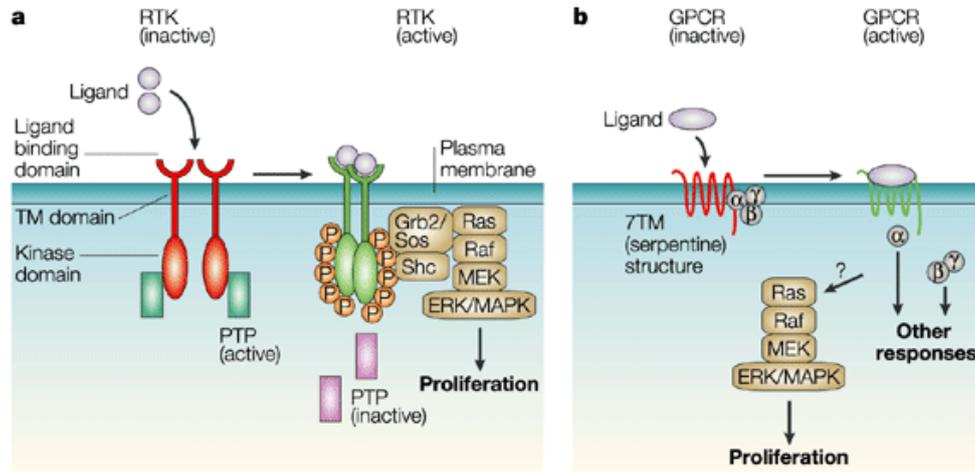


Figura 2. Representación esquemática del ciclo de activación de un GPCR. Extraído de Syrovatkina et al., 2016 (35).

Existen 21 subunidades $G\alpha$ codificadas por 16 genes distintos, 6 subunidades $G\beta$ codificadas por 5 genes, y un total de 12 subunidades $G\gamma$ codificadas por 12 genes (33). Las subunidades $G\alpha$ se clasifican en cuatro grupos principales diferenciados por su actividad y su estructura. Estas son las subunidades $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q/11}$ y $G\alpha_{12/13}$ (36). La subunidad $G\alpha_s$ se caracteriza por activar la enzima adenilato ciclasa (AC), aumentando así los niveles del segundo mensajero producido por dicha enzima, el monofosfato cíclico de adenosina (cAMP), obtenido a partir del trifosfato de adenosina (ATP) (37). Por el contrario, la subunidad $G\alpha_{i/o}$ se caracteriza por inhibir la AC, por lo que se reducen los niveles de cAMP. La concentración de cAMP intracelular está fuertemente regulada tanto por la actividad de la AC como por las fosfodiesterasas citosólicas (PDE). El cAMP es capaz de unirse a la subunidad reguladora de la proteína quinasa A (PKA) activándola, tras lo cual fosforilará a otras proteínas como factores de transcripción en residuos Ser/Thr específicos. La subunidad $G\alpha_{q/11}$ es responsable de la activación de la fosfolipasa C β (PLC β), un enzima que transforma lípidos de membrana. La actividad de la PLC β genera Inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). EL IP3 es capaz de aumentar los niveles de calcio intracelular, y el DAG es responsable de la activación de la proteína quinasa C (PKC) (38). En último lugar, las subunidades $G\alpha_{12/13}$ se caracterizan por presentar como mediadores proteínas Rho, que poseen actividad GTPasa (38).

Como ya se ha mencionado, el dímero $\beta\gamma$ posee actividad al igual que la subunidad $G\alpha$, activando distintas vías de señalización. Se ha descrito que es capaz de activar canales de potasio, así como de regular la AC y otros componentes celulares. Asimismo, este dímero es capaz de activar la vía de las MAP kinasas a través de la proteína Ras (39). La activación de la vía de las MAP Kinasas se había descrito como un fenómeno dependiente de la activación de receptores con actividad tirosina quinasa (TRK) (Figura 3A), pero se determinó que era posible activar también esta vía a través de GPCR, mediante el fenómeno denominado transactivación (Figura 3B) (39) (40). Este proceso

se inicia con la activación de Ras, que desencadena una cascada de fosforilaciones de distintas proteínas de la familia Raf (donde destacan c-Raf y b-Raf) y MEK1/2. Esta última se encuentra unida a la proteína ERK en estado basal, pero tras fosforilarse se produce su disociación, por lo que ERK puede moverse libremente a distintos lugares de la célula, incluido el núcleo (41).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura 3. Esquema de la activación de la vía de las MAP quinasas mediada por TRK (A), o por GPCR (B). Extraído de Wetzker R, Böhmer F-D 2003 (42).

1.1.5. Control de la señalización de los GPCR

La terminación de la señalización es un fenómeno tan importante como la activación del receptor, la transducción de la señal hacia el interior de la célula y el inicio de las distintas vías de señalización. Este proceso tiene una elevada relevancia funcional, puesto que a nivel fisiológico la desregulación de la actividad de los GPCR y otros receptores de membrana puede desencadenar distintas patologías como el cáncer. El proceso mediante el cual un receptor disminuye su señalización tras activarse mediante un agonista se denomina desensibilización (43), y está mediado por distintos mecanismos.

La desensibilización se inicia mediante la fosforilación del receptor en residuos de serina y treonina del tercer loop intracelular y de la región carboxilo terminal por quinasas de receptores acoplados a proteína G (GRKs) (44). Esta fosforilación permite el anclaje al receptor de proteínas denominadas β -arrestinas que desacoplan al receptor de la proteína G, produciendo una disminución de la señal (45). También juegan un papel importante en el tráfico celular. Así, el complejo GPCR fosforilado/ β -arrestina es capaz de reclutar proteínas denominadas clatras, dando lugar a la internalización del receptor en vesículas donde podrá ser desfosforilado y enviado de nuevo a la membrana plasmática, o degradado mediante la unión de las vesículas de clatrina con lisosomas (Figura 4). La unión del receptor a la β -arrestina difiere según el tipo de GPCR. Por ejemplo, en el caso de los receptores de la familia A, la interacción es más corta, y normalmente los receptores se reciclan con rapidez a nivel de membrana, mientras que

los miembros de la familia B presentan una unión más fuerte a las β -arrestinas y su destino final suele ser la degradación lisosómica (46). También puede producirse una disminución en la expresión del receptor como respuesta a la activación (47). La afinidad del receptor por las β -arrestinas influye en la velocidad a la que se produce la desensibilización. En algunos casos, como en el receptor adrenérgico β_2 -AR, la disociación del receptor y las β -arrestinas se produce incluso cuando el receptor se encuentra fosforilado por las GRKs (48).

La función de las β -arrestinas no es únicamente la finalización de la señalización del receptor. Se ha descrito la capacidad de estas proteínas de activar ciertas vías de señalización (49). Gracias a su capacidad de formar *scaffolds* o puentes entre proteínas, las β -arrestinas forman complejos con componentes de la vía de las MAPK, activándolos, o incluso en el caso de la proteína ERK fosforilada, secuestrándolos en el citoplasma (50). Recientemente, se ha descrito la existencia de un sitio de unión de la β -arrestina al receptor que podría estar implicado en diferentes procesos de señalización (51). La activación de la vía de las MAPK mediante β -arrestinas es más lenta en comparación con su activación directa vía GPCR, pero multiplica la complejidad de los procesos de señalización celular y las posibles respuestas derivadas de la activación de los receptores acoplados a proteína G.

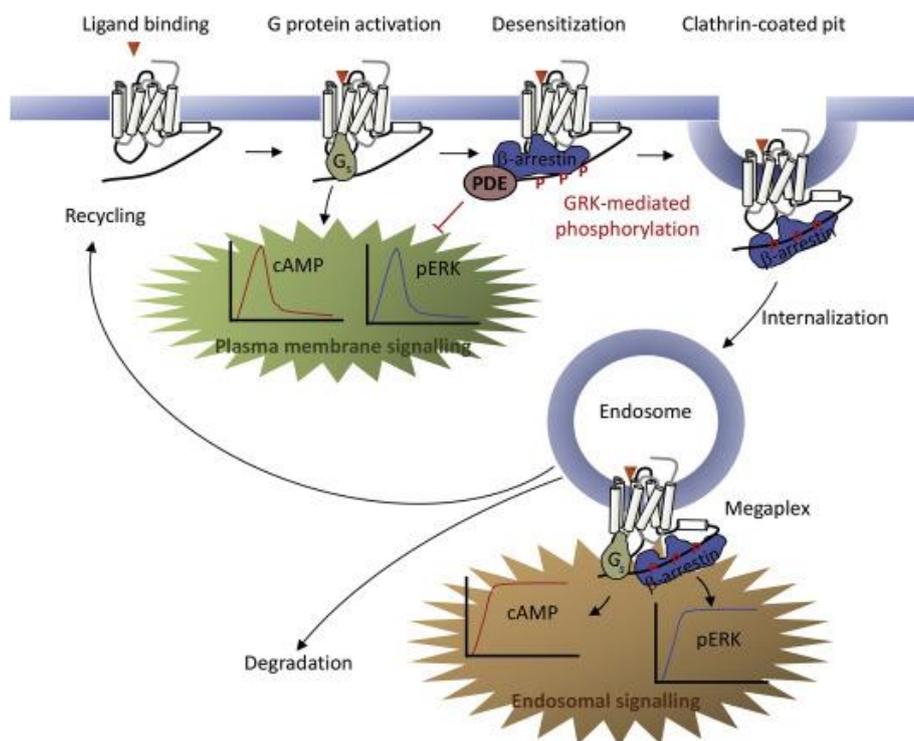


Figura 4. Representación esquemática del proceso de activación/desensibilización de un GPCR mediado por arrestinas. Extraído de Reiter E, et al., 2017 (52).

1.1.6. Ligandos de los GPCR

Normalmente, la activación de un GPCR se produce mediante la interacción del receptor con su agonista endógeno. Este proceso da lugar a cambios conformacionales en su estructura que a su vez provocarán cambios en la integridad de la proteína G, disociando sus subunidades y dando lugar a la iniciación del proceso de señalización

celular. La unión del agonista se produce en el sitio ortostérico del receptor, que acostumbra a encontrarse en la región amino terminal del receptor o en regiones transmembrana (53). Existen también regiones alostéricas a través de las cuales se puede regular la actividad mediada por agonista. Se ha descrito que los GPCR pueden encontrarse en dos estados de activación distintos, en un estado inactivo (R), o activo (R*), es decir, unidos o no a su propio agonista. Estos dos estados acostumbran a estar en equilibrio (54). Sin embargo, existen cada vez más evidencias de la existencia de múltiples estados de activación del receptor (55). También ha sido descrito un estado de activación constitutiva de los GPCR en ausencia de agonista (56).

Cuando un ligando se une a un GPCR estabiliza al receptor en un determinado estado de activación. Estos compuestos son muy diversos, comprendiendo iones, fotones, vitaminas, nutrientes, hormonas, proteínas y neurotransmisores, así como diversas sustancias exógenas. Si un agonista es capaz de inducir una respuesta del 100% en un receptor es considerado como un agonista total. Algunos neurotransmisores y hormonas son capaces de generar este tipo de respuestas. En cambio, un compuesto que provoca una respuesta menor del 100% es considerado como un agonista parcial. Por otro lado, existen sustancias capaces de unirse a un GPCR y bloquear la actividad del receptor. Estas sustancias se denominan antagonistas. Algunos compuestos pueden considerarse agonistas inversos si reducen la actividad constitutiva del receptor, o antagonistas neutros, que no afectan a la actividad constitutiva del receptor (57) (58) (Figura 5).

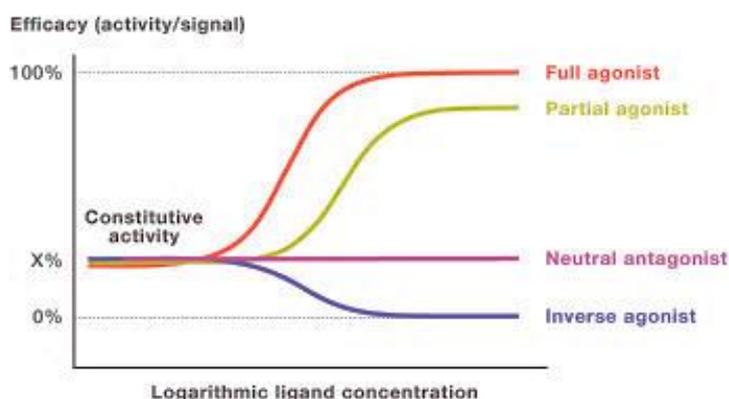


Figura 5. Caracterización de la actividad de distintos ligandos sobre la actividad del receptor. Extraído de Wacker D, Stevens RC and Roth BL, 2017 (58).

Mientras que agonistas y antagonistas se unen al sitio ortostérico del receptor, existen sustancias capaces de unirse a regiones distintas, denominadas sitios alostéricos, modulando la actividad de los ligandos. Estas sustancias pueden tener un efecto positivo o negativo sobre la actividad de los compuestos que actúan en el sitio ortostérico, potenciando o inhibiendo la función del agonista o antagonista, y pueden ser de origen endógeno o exógeno. Existen también algunos compuestos, denominados bitópicos, que pueden actuar tanto en sitios alostéricos como ortostéricos, y en este último caso como agonistas o antagonistas (59).

En los últimos años se ha descubierto un nuevo horizonte en el estudio de la farmacología de los GPCR y en el desarrollo de fármacos específicos gracias al estudio del denominado *biased agonism* (60). Este fenómeno implica que ligandos distintos pueden dar lugar a respuestas diferentes sobre un mismo receptor (Figura 6). Es decir,

activar determinadas vías de señalización y no otras (61). En otras palabras, poder desarrollar fármacos que provoquen únicamente las respuestas deseadas en un tratamiento específico de una enfermedad, lo que ayudaría a evitar efectos no deseados. Así, un mismo ligando podría estar activando unas vías de señalización, sin afectar o afectando en menor grado a otras, y por lo tanto los conceptos de agonistas totales, parciales y antagonistas perderían el sentido y habría que analizar el efecto sobre las diferentes respuestas ejercidas por el receptor al unir cada ligando. Con el descubrimiento del *biased agonism*, el hecho de que un receptor pueda encontrarse en más de dos estados conformacionales (R y R*) (62), la descripción de la señalización por medio de arrestinas y el descubrimiento de que proteínas G de diferentes familias pueden unirse a un mismo receptor (63), los modelos ternarios constituidos por receptor, ligando y proteína G para definir GPCR deberían ser revisados y ampliados.

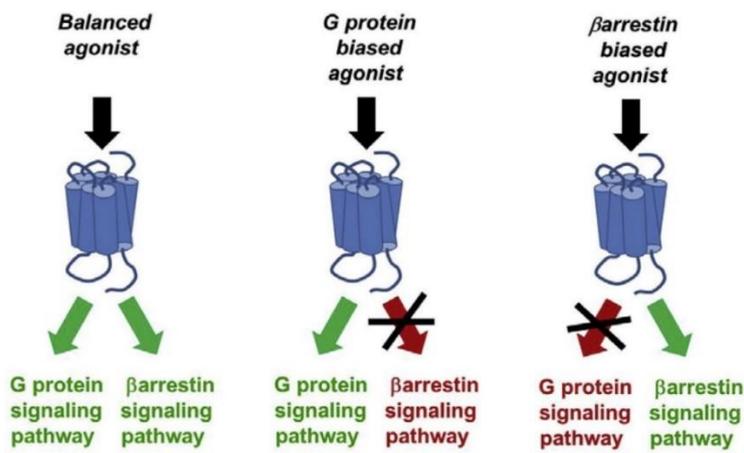


Figura 6. Fenómeno del *biased agonism*. La unión de un agonista puede desencadenar una respuesta balanceada, o activar únicamente determinadas vías de señalización. Extraído de Rankovic Z, Brust TF, Bohn LM, 2016 (64).

1.2. El fenómeno de la oligomerización de GPCR

1.2.1. Interacción entre receptores

Los GPCR forman parte de una amplia red en la membrana plasmática junto con las proteínas que interactúan con ellos (denominadas *GPCR interacting proteins*, o GIP por sus siglas en inglés) (65). Ya se ha mencionado el acoplamiento a proteínas G y la interacción con otros componentes de la maquinaria celular como las β -arrestinas, fenómeno fundamental para explicar la señalización de estos receptores y para la transducción de las señales extracelulares. Pero la complejidad de estas proteínas no termina en este punto. Inicialmente se pensó que los GPCR funcionaban como unidades monoméricas que interactuaban con las proteínas G siguiendo una estequiometría 1:1. Sin embargo, en la década de los noventa se demostró por primera vez la capacidad de los GPCR de interactuar entre ellos (66), ampliando la farmacología de estos receptores (67) (68). No obstante, en la actualidad, aún existe debate entre algunos investigadores sobre la posible existencia de alguna relevancia funcional en dicho fenómeno (69).

Ya en los años 70 existían evidencias de la cooperación entre receptores acoplados a proteína G, como es el caso del receptor β_2 -Adrenérgico, considerándose que existía una

interacción negativa entre diferentes unidades de este mismo receptor (70). Un estudio sobre el GPCR GNRHR empleando antagonistas unidos mediante anticuerpos específicos demostró que la aproximación y agregación de los receptores era suficiente para activarlos (71). En los años 90, algunos investigadores llegaron a la conclusión de que la formación de oligómeros de receptores de membrana era esencial para su propia señalización (72). También se describió la existencia de oligómeros de algunos GPCR, como es el caso del receptor metabotrópico de glutamato, capaz de formar homodímeros (73). Otros estudios evidenciaron este fenómeno mediante la construcción de quimeras. Maggio y colaboradores pusieron en práctica este procedimiento, diseñando quimeras del receptor muscarínico M₃ y del receptor adrenérgico α_2 A. Intercambiaron porciones de la región carboxilo terminal de ambos receptores y llevaron a cabo ensayos de *binding* empleando el ligando N-[³H] metil-escopolamina del receptor M₃ y el ligando adrenérgico [³H] rauwolscina, determinando que la expresión individual de los receptores era insuficiente para unir los ligandos, y precisando que la coexpresión de ambas quimeras era suficiente para proporcionar curvas de *binding* y respuestas celulares (74).

Este último estudio es muy importante puesto que implica un nivel superior de interacción entre GPCR. La oligomerización no ocurre únicamente entre receptores del mismo tipo para dar lugar a homodímeros. También es posible que dos GPCR diferentes interactúen dando lugar a un heterodímero. Incluso es posible la formación de estructuras más complejas y de mayor magnitud, con más de dos receptores (75). El descubrimiento de estos fenómenos ha podido ser caracterizado gracias al desarrollo de novedosas técnicas que han permitido determinar la existencia de este tipo de complejos macromoleculares, como el *Single fluorescent-molecule video imaging and tracking* (76).

Actualmente, existen claras evidencias que demuestran que los GPCR pueden señalizar siguiendo una estequiometría 1:1 con su propia proteína G. Esto se ha determinado empleando nano-discos, estructuras que contienen lípidos en disposición de bicapa estabilizados por proteínas de anclaje MSP y que permiten purificar proteínas de membrana como los GPCR (77). Sin embargo, numerosos estudios apoyan la idea de la formación de estructuras proteicas de un grado superior necesarias para la señalización de los GPCR (78) (79) (80). El dímero sería la unidad mínima de interacción entre GPCR, pudiendo existir estructuras superiores en las que por ejemplo, predominan los tetrámeros de GPCR, y donde la unión a ligando es capaz de estabilizar el complejo (81). Estas estructuras se organizarían en forma de clústeres, dentro de los cuales cada uno de los protómeros que componen los oligómeros podría encontrarse en un estado de activación diferente (82).

1.2.2. Características de la interacción

La explicación de cómo los GPCR se estructuran en complejos oligoméricos contempla dos posibilidades. Una primera idea propone la interacción directa entre ambos receptores, existiendo una interacción física. Por otro lado, los componentes del citoesqueleto y otras proteínas podrían servir de *scaffold proteins* y ayudar a que los GPCR interactúen de forma indirecta. De esta forma los receptores podrían “comunicarse” entre ellos y dar lugar a respuestas celulares distintas a la de las unidades

por separado, gracias a que se encontrarían formando parte de una estructura de proteínas celulares pero sin interactuar físicamente entre sí (83).

La formación de oligómeros de manera directa implica la interacción física entre GPCR a través de su propia estructura. Existen diversas teorías sobre cómo y cuándo se forman las interacciones entre los receptores. Algunos autores han propuesto la existencia de receptores únicamente en forma de oligómeros en la célula, como es el caso del receptor D₂R, de tal forma que el tráfico del receptor a la membrana plasmática solo puede producirse en forma de dímero (84). Esto significa que el oligómero se constituye en el proceso de síntesis y se transporta a la membrana de esta forma. También se ha mencionado la unión de ligando como fenómeno necesario para el establecimiento de interacciones directas entre receptores β₂-adrenérgicos. Otros autores, sin embargo, proponen que los GPCR pueden encontrarse tanto en poblaciones monoméricas como en forma de oligómeros en la membrana plasmática, de tal forma que continuamente se forman y se deshacen estos complejos en intervalos muy cortos de tiempo (85). La composición de los lípidos de membrana también se considera importante en la oligomerización de los receptores. Ha sido descrita la existencia de *hot-spots* en la membrana plasmática en los que la predominancia del colesterol favorecería la formación de oligómeros (86). Otro fenómeno que podría tener un peso importante en la formación de complejos oligoméricos es el llamado *hydrophobic mismatch* o desajuste hidrofóbico: Cuando la longitud de los segmentos transmembrana hidrofóbicos de una proteína excede el grosor de la propia membrana, para poder reducir la exposición de los segmentos hidrofóbicos de la proteína al ambiente hidrofílico extracelular y citosólico, los receptores se podrían organizar en complejos de oligómeros (87) (88).

La interacción directa entre GPCR puede producirse gracias a enlaces covalentes en forma de puentes disulfuro, y mediante interacciones electrostáticas e hidrofóbicas. Un ejemplo de interacción covalente entre GPCR es la interacción entre los dominios amino terminal de ambos receptores, como es el caso de algunos miembros de la familia C de GPCR. Un caso concreto es el receptor metabotrópico de glutamato mGluR₁, que homodimeriza estableciendo un puente disulfuro entre las cisteínas de la posición 140 de la secuencia de ambos monómeros (89). Otro ejemplo es la interacción del receptor mGluR₅ y el receptor sensor de calcio extracelular CaR, donde se produce una interacción a nivel del dominio amino terminal por puentes disulfuro y también interacciones de tipo hidrofóbico entre segmentos transmembrana (90) (91). Otro ejemplo de interacción hidrofóbica es el propuesto para el receptor β₂-adrenérgico, en el que determinados residuos de glicina y leucina del dominio transmembrana seis del receptor son necesarios para establecer el dímero (92), algo que al parecer también sucede con el receptor D₂ de dopamina (93). Otros receptores interactúan mediante fuerzas electrostáticas, como es el caso de los receptores D₁ y D₂ de dopamina, los cuales dimerizan mediante un motivo rico en argininas del tercer loop intracelular del receptor D₂ y un motivo rico en aminoácidos con carga negativa del receptor D₁ (94). Cabe destacar que es posible que estas interacciones directas entre GPCR se establezcan por medio de interacciones en la región carboxilo terminal, a través de los dominios *coiled-coil*. Por ejemplo, los receptores GBR₁ y GBR₂ de ácido γ-aminobutírico interactúan entre ellos mediante estos dominios, aunque la eliminación de los segmentos carboxilo terminal de ambos protómeros no afecta a la formación del dímero (95). En cambio, la

existencia del dominio *coiled-coil* y de la región carboxilo terminal si son esenciales en la formación de los dímeros del receptor δ -opioide (96).

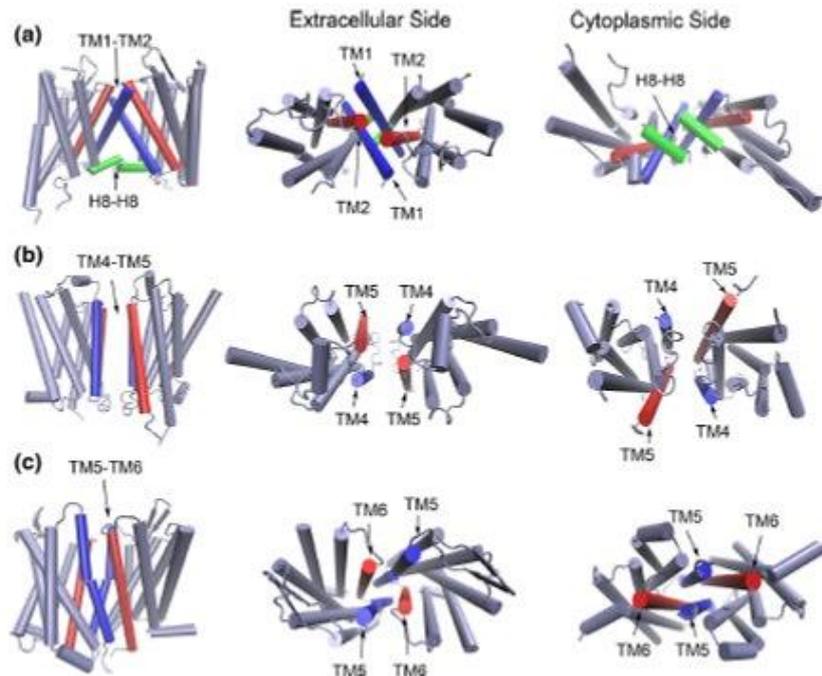


Figura 6. Modelos propuestos de interacción entre dominios transmembrana en dímeros de receptores κ -opioide (A), β 1-adrenérgico (B) y μ -opioide (C). Extraído de Fotis A. Baltoumas, Margarita C. Theodoropoulou & Stavros J. Hamodrakas, 2016 (97).

Estudios bioinformáticos recientes han permitido investigar a fondo la estructura de los oligómeros de GPCR (98). Parte del análisis se ha centrado en la secuencia de los receptores, buscando los posibles motivos a través de los cuales se establece la interacción, teniendo en cuenta la conservación de los aminoácidos al alinear las secuencias estudiadas y la entropía de estas interacciones. Según los modelos de predicción y estudios realizados, parece que los dominios TM 1, 4, 5 y 6, así como la hélice citoplasmática 8 juegan un papel importante en la formación de oligómeros (99). También se ha determinado una alta frecuencia de interacciones entre los dominios transmembrana TM1, TM2 y la hélice 8, entre el TM4 y el TM5, y entre el TM5 y el TM6 (100) (figura 6). Un ejemplo concreto es el receptor de rodopsina, donde se ha propuesto una interacción entre los dominios TM4 y TM5 (modelo IV-V) en el que interacciones entre los dominios TM1 y MT2 y el dominio IC3 facilitarían la agrupación del dímero (101). Otros autores proponen que los receptores interaccionan en disposición *head to head*, siendo relevantes los dominios TM 1, 4, 4/5 y 5/6 (102), proponiendo que el modelo más probable es el de los dímeros de TM1 y TM4/TM5, ya que en el modelo TM4 no quedaría espacio para acomodar la proteína G, y en el modelo TM5/TM6 no podrían tener lugar los cambios conformacionales necesarios para la señalización.

1.2.3. Métodos de estudio de los oligómeros de GPCR

La primera evidencia de la existencia de interacciones entre GPCR surgió del estudio del fenómeno de cooperación entre receptores. Los investigadores observaron cambios

en las curvas de *binding* en determinados receptores de membrana en presencia de sus respectivos radioligandos, y llegaron a la conclusión de que existía algún tipo de cooperación entre estos, en algunos casos positiva (la unión a ligando está favorecida) y en otros negativa (la unión a ligando está desfavorecida), y que podría llegar a explicarse mediante la formación de complejos de orden superior al monómero (103) (104). Este método permitió, por ejemplo, detectar dímeros del receptor D₂ de dopamina en cerebro humano y de rata, empleando preparaciones de membranas de tejido cerebral (105). Las muestras empleadas en este tipo de técnicas no presentan componentes de la maquinaria celular que permitan a los receptores comunicarse entre sí, por lo tanto, aquellos cambios detectados en la unión a radioligandos solo pueden producirse por la interacción física entre los GPCR.

Otra técnica relevante y ampliamente extendida para la detección de complejos oligoméricos de GPCR ha sido la co-inmunoprecipitación (co-IP). De manera resumida, muestras de tejido o células transfectadas con el DNA de los receptores que se quieran estudiar, serán disgregadas y consecutivamente las proteínas de membrana serán solubilizadas. Para detectar los GPCR y los posibles complejos oligoméricos formados se emplearán anticuerpos específicos frente a epítomos concretos de los receptores sobre los que se centre el estudio. En un primer lugar se inmunoprecipitará uno de los receptores mediante un anticuerpo altamente específico. Seguidamente, se llevará a cabo un *western-blot* con anticuerpos específicos de los receptores que se sospecha forman oligómeros (106) (107). En el caso de que los GPCR interaccionen entre ellos, la inmunoprecipitación del receptor problema inducirá la precipitación de los otros receptores del complejo, pudiendo ser detectados mediante la técnica de *western-blot*.

La co-IP ha sido empleada en la detección de diversos oligómeros. Un ejemplo es el homodímero del receptor δ -opioide (108) y los heterodímeros de este mismo receptor con el receptor β_2 -adrenérgico (109). También ha servido para detectar diversos heterodímeros como los de los receptores A₁ de Adenosina y el receptor D₁ de dopamina (110), los formados entre el receptor sensor de calcio CaR y el receptor metabotrópico de glutamato mGluR₁ (111) o el heterodímero del receptor A₁ de adenosina y el receptor purinérgico P2Y1 (112). Sin embargo, una gran limitación de esta técnica es la producción de artefactos durante la solubilización de los receptores de membrana que darán lugar a falsos positivos. Es decir, si dos receptores que no forman oligómeros entre sí se encuentran suficientemente cerca en un fragmento de membrana, el uso de determinados detergentes podría favorecer la agregación de las proteínas, aunque no se encuentren interaccionando físicamente entre sí.

Existe una gran variedad de técnicas de detección de oligómeros de GPCR basadas en el trabajo del científico alemán Theodor Förster, quien en 1948 desarrolló la teoría de la transferencia de energía por resonancia (RET) (113). El RET consiste en la transferencia de energía no radioactiva entre dos cromóforos que se encuentren a una distancia determinada, mediante un mecanismo dipolo-dipolo. Uno de los cromóforos será excitado y actuará como dador de energía, la cual será captada por el otro cromóforo, que hará las funciones de aceptor. En la detección de complejos de GPCR, los cromóforos pueden consistir en compuestos fluorescentes o fluoróforos/fluorocromos, por lo que hablaremos de *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET), o en una sustancia bioluminiscente que actúa como dador de energía y un fluoróforo que actúa como aceptor, en cuyo caso nos referiremos a la técnica de *Bioluminescence Resonance*

Energy Transfer (BRET). Para que la transferencia de energía tenga lugar entre ambas moléculas, es necesario que se cumplan ciertos requisitos. Primero, que los espectros de emisión y de absorción de las moléculas dadora y aceptora se solapen, para que parte de la energía emitida por la molécula dadora sea transferida a la aceptora. Segundo, que ambas moléculas se encuentren a una distancia inferior a 10 nm o 100 Å. La eficiencia de la transferencia de energía entre los cromóforos decae con la sexta potencia de la distancia. Es importante tener en cuenta el fenómeno del fotoblanqueo, que implica la pérdida de actividad de un fluoróforo por exceso de exposición, interrumpiéndose así la transferencia de energía entre ambos cromóforos.

La técnica de FRET emplea proteínas fluorescentes que son variedades mutantes de la proteína fluorescente verde GFP, procedente de la medusa *Aequorea victoria*. Cada una de las mutaciones otorga propiedades diferentes de la GFP original, con espectros de emisión y absorción distintos. Mediante técnicas de ingeniería genética se pueden obtener proteínas, como los GPCR, fusionadas por su extremo carboxilo o amino terminal o en mitad de la secuencia a una de estas proteínas fluorescentes. Si dos proteínas fusionadas se encuentran lo suficientemente cerca en la membrana plasmática, se podrá determinar *in vivo* la transferencia de energía entre ambos fluoróforos, y, por lo tanto, demostrar la existencia de complejos oligoméricos. En la técnica de FRET existen diferentes combinaciones de fluoróforos que se pueden utilizar, como la proteína fluorescente cian (CFP) y la proteína fluorescente amarilla (YFP) (114), aunque habitualmente se emplea la pareja compuesta por las proteínas GFP² e YFP. La proteína GFP² es capaz de excitarse a una λ de 400 nm, emitiendo a 510 nm, mientras que la YFP se excita a una λ de 485 nm y emite a 530 nm, existiendo solapamiento entre los espectros de emisión y de absorción de las moléculas dadora y aceptora (115) (116) (Figura 7).

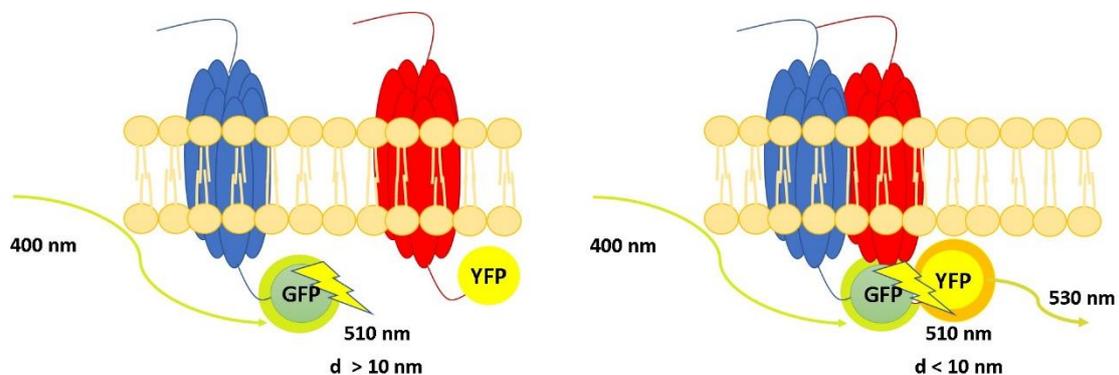


Figura 7. Representación esquemática de la transferencia de energía por FRET entre las proteínas fluorescentes GFP e YFP.

La técnica de BRET se diferencia de la técnica de FRET en que el dador es una variante de una enzima bioluminiscente, la luciferasa (*Rluc*), obtenida del organismo *Renilla reniformis*. Esta proteína cataliza una reacción bioquímica que produce la liberación de un fotón empleando como sustrato coelenterazina H. De nuevo, el fluoróforo que actúe como molécula aceptora debe solapar su espectro de absorción con el de emisión de la enzima y encontrarse a una distancia inferior a 10 nm para que se produzca una transmisión de energía eficaz que muestre la interacción entre las dos proteínas de estudio (117). Existen dos variantes descritas de la técnica de BRET, el BRET¹ y el BRET² (Figura 8). La diferencia entre ambas se encuentra tanto en el sustrato de *Rluc* como en

la variante de GFP empleada como molécula aceptora. En el BRET¹, el sustrato metabolizado es la coelenterazina H, liberándose un fotón con una λ de 480 nm que será captado por la variante YFP, emitiendo a 530 nm. En el BRET² el sustrato de la *Rluc* es el *DeepBlueC*. La metabolización de esta sustancia libera un fotón con una λ de 400 nm, que será captado por la variante GFP², emitiendo a 510 nm.

El BRET ha sido ampliamente utilizado en la monitorización de oligómeros, incluso más que el FRET. Esta técnica ha permitido detectar tanto homodímeros como heterodímeros en modelos celulares *in vivo*, como los dímeros del receptor δ -opioide (118), los del receptor de la hormona liberadora de tirotropina TRHR (119), los heterodímeros de los receptores de melatonina MT₁ y MT₂ (120), los homo y heterodímeros de los receptores β_1 y β_2 adrenérgicos (121), los heterodímeros de los receptores de quimiocinas CXCR₁ y CXCR₂ (122), los heterodímeros del receptor D₂ de dopamina y 5-HT_{2A} de serotonina (123) o los del receptor D₂ y D₄ de dopamina (124).

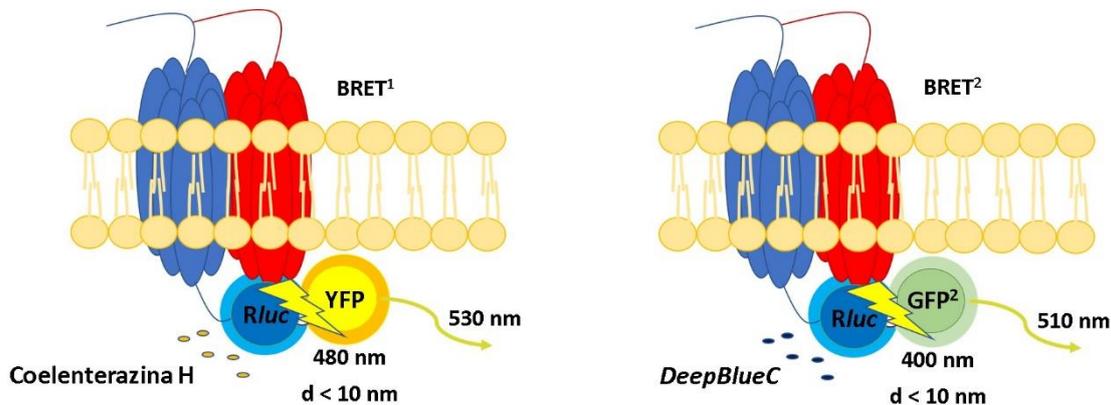


Figura 8. Representación esquemática del fundamento del BRET¹ y el BRET².

Han sido desarrolladas distintas variantes de la técnica de FRET como el *Time-resolved* FRET, que ha permitido emplear ligandos de GPCR marcados para detectar oligómeros en tejido nativo (124), o la técnica de recuperación de la fluorescencia tras el *photobleaching*, empleando microscopios especializados. También existen otras técnicas basadas en la transferencia de energía entre biomoléculas como el FRET-FLIM *microscopy* y otros protocolos ingeniosos como el *Sequential Resonance Energy transfer* (SRET) (125), o la *Bimolecular Fluorescence Complementation* (BiFC) y el *Bimolecular Luminescence Complementation* (BiLC) (Figura 9), que forman parte de los protocolos conocidos como *Protein Complementation Assays* (PCA) (126).

El SRET combina de forma secuencial las técnicas de BRET y FRET y permite detectar complejos oligoméricos de más de dos subunidades. Para ello es necesario utilizar fluoróforos cuyas longitudes de onda se solapen. Por ejemplo, puede emplearse un receptor fusionado a la enzima luciferasa (*Rluc*), otro fusionado a la proteína GFP² y otro a la proteína YFP. La oxidación del compuesto *DeepBlueC* por la enzima *Rluc* liberará un fotón que será captado por la proteína GFP² (BRET²), que a su vez emitirá energía a una longitud de onda que puede ser captada por la proteína YFP (FRET).

En el BiFC se expresan por separado dos fragmentos no fluorescentes de la proteína fluorescente YFP, denominados n y c, fusionados a receptores distintos. En el caso de que ambos receptores interactúen, la proximidad de ambos fragmentos permitirá la reconstitución del fluoróforo y la adquisición de sus propiedades fluorescentes, y por lo

tanto emitirá luz al ser excitado a la longitud de onda característica, teniendo en cuenta que la distancia necesaria para que esto ocurra debe ser menor de 6 nm (127). La combinación de esta técnica con el BRET convencional permite detectar oligómeros de orden superior, formados por más de dos receptores (128).

Similar al BiFC, recientemente se ha desarrollado el BiLC, que implica la expresión por separado de dos fragmentos no luminiscentes de la proteína *Renilla* Luciferasa, fusionados a receptores distintos. En esta ocasión, la actividad de la enzima se verá reconstituida en el caso de que los dos receptores oligomericen. Esta técnica se ha empleado, por ejemplo, en la detección de complejos oligoméricos del receptor D₂ de dopamina (129). La combinación de las técnicas de BiFC y BiLC posibilita el estudio de oligómeros complejos en membranas de células vivas, y se ha empleado principalmente en el estudio de estructuras tetraméricas (130). Existe también una variante de esta técnica, conocida como *multicolor* BiFC, que emplea combinaciones de fluoróforos diferentes permitiendo estudiar multímeros a nivel de membrana plasmática (131).

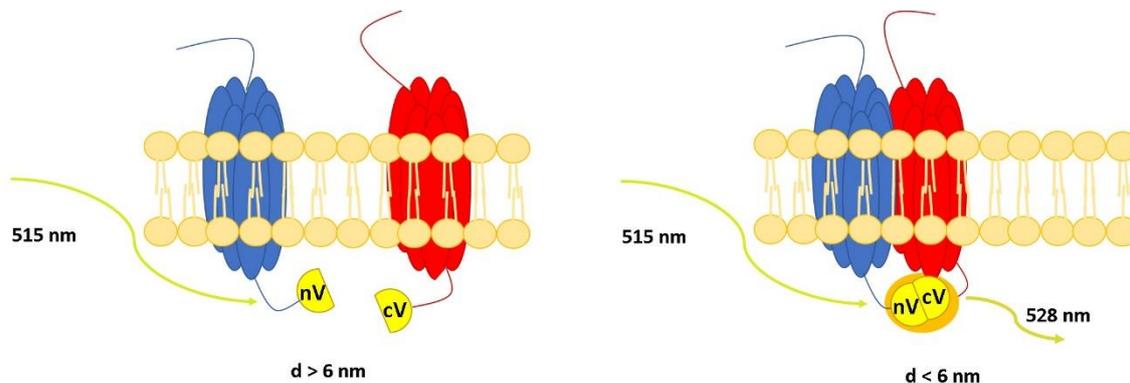


Figura 9. Representación esquemática del fundamento del BiFC con la proteína venus como fluoróforo.

Además de los protocolos basados en técnicas de transferencia de energía por resonancia, existen también métodos para la detección de interacciones entre GPCR dentro del campo de la microscopía. Algunas de estas técnicas son el TIRF o *Total Internal Reflectance Fluorescence microscopy*, la microscopía basada en inmunofluorescencia (IFM), aquellas técnicas que precisan de microscopios electrónicos como la microscopía inmunoelectrónica y la microscopía de fuerza atómica (AFM), además de otras técnicas relacionadas con la microscopía confocal.

Precisamente, mediante el uso de la microscopía confocal, ha sido desarrollada una novedosa técnica, denominada *Proximity Ligation Assay* (PLA) (Figura 10) (132), que permite detectar interacciones proteína-proteína en tejidos o muestras celulares fijadas. Al igual que en otras técnicas de inmunohistoquímica o de inmunocitoquímica, se precisa de anticuerpos primarios procedentes de especies diferentes frente a epítopos de los receptores de estudio. A estos se unirán posteriormente las denominadas PLA *probes*, que son anticuerpos secundarios específicos frente a la especie de los anticuerpos primarios y que llevan unido a su fracción constante un oligonucleótido. Seguidamente, es necesario adicionar una ligasa, y si los anticuerpos se encuentran a una distancia inferior a 40 nm, ambos oligómeros serán unidos en una única secuencia circular. Posteriormente, esta secuencia podrá ser amplificada con oligonucleótidos marcados por una polimerasa con características particulares. El

resultado es analizado mediante microscopía confocal y se observa como puntos rojos sobre núcleos marcados en azul con Hoechst.

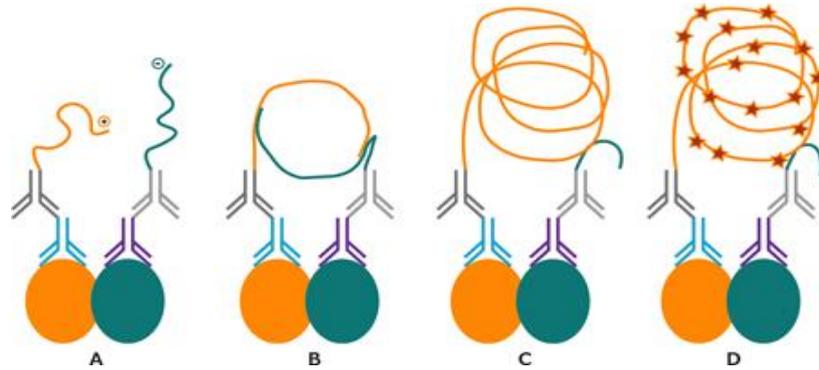


Figura 10. Fundamento de la técnica de PLA. Extraído de PLA Duolink®, Sigma-Aldrich.

1.2.4. Significado funcional de los oligómeros

La detección de oligómeros de GPCR a nivel de membrana plasmática no aporta información acerca del sentido de este tipo de interacciones ni sobre cuáles son sus efectos a nivel farmacológico. Sin embargo, existe un gran número de técnicas bioquímicas que permiten analizar las respuestas celulares derivadas de este complejo fenómeno. Hay evidencias de que la formación de homo y heterodímeros de GPCR aportan características farmacológicas diferentes de las de las unidades monoméricas (133), afectando tanto a la capacidad señalizadora (134) como a la desensibilización, la internalización, la síntesis y el tráfico del receptor (135) (136) (Figura 11). Esto ha conducido a reconsiderar cual es la unidad funcional en los distintos GPCR y también a elaborar nuevas estrategias en el diseño de fármacos, teniendo en cuenta todas las evidencias de que los GPCR no señalizan únicamente como unidades monoméricas.

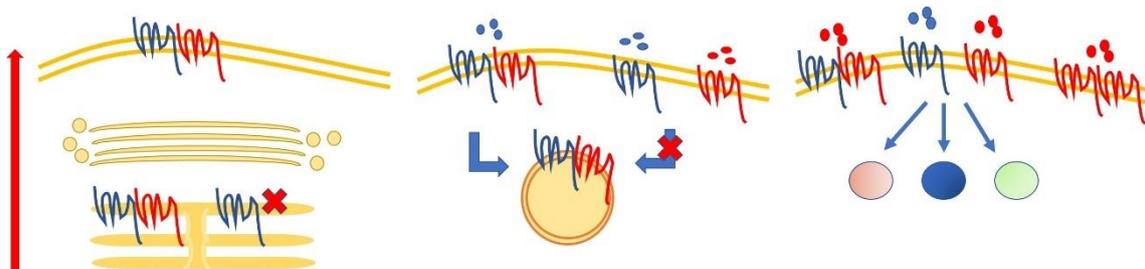


Figura 11. Significado funcional de los oligómeros de GPCR.

Ha sido planteado si los GPCR interactúan entre ellos a nivel de la membrana plasmática, o si por el contrario el ensamblaje de los receptores ocurre durante la síntesis de los receptores, es decir, desde el retículo endoplasmático (RE), y si este proceso es necesario para la correcta expresión de los GPCR a nivel de membrana plasmática. Todo un clásico es el ejemplo de los receptores GABA_B; en el caso de los receptores GABA_{B1} y GABA_{B2}, la formación de heterodímeros ocurre en el RE y la ausencia de GABA_{B2} y por lo tanto del heterodímero afecta negativamente la expresión de GABA_{B1} a nivel de membrana plasmática, quedando retenido intracelularmente en forma de glicoproteína inmadura. Por otro lado, GABA_{B2} sí es capaz de ser transportado a la membrana incluso en ausencia de GABA_{B1}, pero siendo incapaz de unir ácido γ -

aminobutírico o de inducir respuestas celulares. Se considera que GABA_{B2} estaría actuando como una chaperona responsable del correcto plegamiento y transporte a membrana de GABA_{B1}. Además, la interacción a través de los dominios *coiled-coil* de los extremos carboxilo terminal de ambas subunidades ocultaría secuencias de retención en RE (137) (138). Un proceso similar ha sido descrito para los receptores de vasopresina V₁ y V₂ y los de oxitocina OTR. La co-inmunoprecipitación de homodímeros y heterodímeros de formas tanto glicosiladas como sin glicosilar ha demostrado que la formación de oligómeros ocurre en fases tempranas de la síntesis proteica. Además, la separación por gradiente de componentes citoplasmáticos ha demostrado mediante la técnica de BRET la existencia de dímeros en la membrana del RE (139).

El uso de mutantes truncados, algunos de ellos de origen natural, también ha servido para estudiar la relevancia de los complejos de dos o más receptores. La expresión de este tipo de especies en presencia de la forma *wild-type* ha demostrado que receptores como el D₂ de dopamina existen únicamente como oligómeros, puesto que al coexpresar la forma mutante junto con la forma *wild-type* del receptor D₂ no se produce una correcta translocación a la membrana (84), fenómeno similar al ocurrido en el caso del receptor D₃ de dopamina, donde la coexpresión del mutante de D₃ y de la forma nativa deslocaliza el receptor, regulando la expresión del receptor en membrana y su unión a ligando (140). Estas mutaciones pueden ser responsables de importantes efectos en el desarrollo de determinadas enfermedades, como es el caso de la variante CCR5Δ32 del receptor CCR₅, que actúa como correceptor del virus de inmunodeficiencia humana (HIV-1). Esta mutación se encuentra presente en algunos individuos caucásicos, siendo homocigotos para la misma un porcentaje muy pequeño de la población. Mientras que la forma *wild-type* sigue un proceso normal de síntesis, modificaciones post-traduccionales y transporte hacia la membrana en forma de oligómero, en los individuos heterocigotos que presentan la variante CCR5Δ32 y CCR₅, el heterodímero formado por ambos protómeros queda retenido en el RE, retrasando la aparición de los síntomas de la enfermedad. Además, la protección frente a la infección por VIH es mayor en individuos homocigotos para la mutación CCR5Δ32 (141). Este descubrimiento indica la importancia funcional que presenta *in vivo* la oligomerización en el tráfico de receptores de nueva síntesis.

Como se ha comentado con anterioridad, la formación de oligómeros también puede afectar a la internalización mediada por agonista. Por ejemplo, la existencia de un dímero puede favorecer la internalización del complejo en presencia de un determinado ligando incluso cuando esta endocitosis no está favorecida en los protómeros por separado. Esto ocurre, por ejemplo, en el caso del receptor de Tromboxano A₂ (TP ó TXA₂). Este receptor se expresa en dos isoformas distintas: α y β. Cuando TPα se expresa individualmente no sufre endocitosis constitutiva ni inducida por ligando. Sin embargo, en coexpresión con la isoforma TPβ forma dímeros sujetos tanto a endocitosis constitutiva como en respuesta a ligando (142).

A su vez, los oligómeros de GPCR otorgan una farmacología distinta a la de los receptores de manera individual. En algunos casos este efecto se traduce como un cambio en la afinidad de un receptor por un ligando determinado, de tal forma que la formación de complejos oligoméricos puede aumentar o disminuir la afinidad del receptor por su propio ligando. Este fenómeno se demostró en los receptores δ-opioide y μ-opioide. Cuando se expresan por separado forman homodímeros con una elevada

afinidad por sus respectivos agonistas selectivos, así como por sus antagonistas. Sin embargo, cuando ambos receptores son coexpresados en un sistema heterólogo forman heterodímeros que presentan una menor afinidad por estos mismos compuestos. De manera interesante, cuando se emplean combinaciones de agonistas selectivos para ambos GPCR se produce un efecto sinérgico, de tal forma que la unión de un ligando a uno de los receptores potencia la unión del ligando del otro miembro de la pareja heteromérica (143). En el caso de los receptores de quimiocinas CCR₂ y CCR₅ se ha observado que la formación de homo y heterodímeros afecta también a la afinidad de los receptores por sus propios agonistas, aumentándola considerablemente. Además, la respuesta provocada por el heterodímero CCR₂-CCR₅ parece estar mediada por una proteína G distinta de las que comúnmente se acoplan a los dos receptores por separado o en forma de homodímero (144). Este fenómeno también ha podido constatarse en el heterodímero de los receptores muscarínicos M₂ y M₃. La expresión de un mutante del receptor M₂, en el que la asparagina 404 ha sido sustituida por una serina, da como resultado un receptor incapaz de unir ligando. Sin embargo, en presencia del receptor M₃ el heterómero resultante presenta de nuevo una elevada afinidad por la triptamina (145).

Se ha demostrado la formación de heterodímeros entre los receptores Orexina 1 (OX₁) y CB₁ de cannabinoides, donde la localización de los receptores en la membrana está fuertemente regulada por la unión a ligando. El receptor CB₁ expresado en ausencia de OX₁ presenta internalización no mediada por agonista. La presencia de OX₁ no altera dicha característica. Este proceso es revertido en el heterodímero únicamente en presencia de ligandos selectivos de CB₁R o de OX₁R. Además, a nivel de señalización se ha observado que al tratar simultáneamente tanto con el antagonista del receptor CB₁ como con agonistas del receptor OX₁ se produce una menor activación de la vía de las MAPK inducida por OX₁R. Este fenómeno también sucede al tratar simultáneamente con antagonistas del receptor OX₁ y agonistas de CB₁R, donde nuevamente se observa una menor activación de la vía de las MAPK inducida en este caso por CB₁R. Por lo tanto, estaríamos ante un cambio en las propiedades originales de ambos receptores debido a la formación de un heterodímero (146) (147). En el caso de los heterodímeros de los receptores D₂ de dopamina y GHS_{1a} de grelina se produce un interesante fenómeno de regulación alostérica entre ambos. Los dos receptores se expresan en el SNC y poseen funciones distintas. El ligando endógeno de GHS_{1a} es el péptido grelina, el cual es producido en el estómago y desde aquí circula por el torrente sanguíneo hasta atravesar la barrera hematoencefálica. En el hipotálamo, D₂ y GHS_{1a} forman un heterodímero en el que el receptor D₂ es regulado por el receptor de grelina dando como resultado la movilización de calcio mediada por la subunidad βγ de la proteína G y a efectos anorexigénicos de los agonistas de D₂R (148). Esta comunicación entre receptores que forman parte de un oligómero se conoce como *cross-talk*. El *cross-talk* implica que la señalización de uno de los receptores del complejo oligomérico afecta a la señalización del otro protómero. El resultado puede ser una comunicación positiva entre los receptores, donde la activación de uno de los protómeros potencia la señalización del otro receptor del complejo, o negativa, si el efecto es el contrario. También pueden producirse fenómenos de *cross-antagonismo*, donde la inhibición de la actividad de uno de los receptores con su antagonista selectivo puede bloquear la activación por agonista del otro receptor que forma parte del complejo oligomérico (149) (83) (150) (151).

En otros casos se produce una potenciación en el acoplamiento a proteína G, como en el heterodímero del receptor de angiotensina II AT₁ y el receptor de Bradiquinina B₂. La activación de AT₁ en células que expresan únicamente este receptor no modifica la distribución de las proteínas G ni la interacción con éstas. En cambio, la expresión de B₂ en ausencia de AT₁ y la activación con su agonista correspondiente produce un incremento en el acoplamiento a proteína Gα_q. La coexpresión de ambos receptores da como resultado la formación del heterodímero AT₁/B₂ y la consecuente potenciación de la activación de la proteína Gα_q acoplada también al receptor AT₁. Este fenómeno es dependiente del receptor B₂, como ha sido comprobado mediante el uso de mutantes de ambos receptores, e indica un cambio importante en el perfil farmacológico del receptor AT₁ dependiente del heterodímero formado con B₂ (152).

Recientemente se demostró que es posible que la formación de oligómeros provoque cambios en el tipo de proteínas G a las que se acoplan los receptores. Este fenómeno no es muy común, pero ha sido identificado en el heterodímero de los receptores D₂ y CB₁. En condiciones fisiológicas el receptor D₂ está acoplado a proteína Gα_i, al igual que el receptor CB₁. Sin embargo, en células transfectadas con los receptores D₂ y CB₁, la activación simultánea de ambos receptores muestra un cambio de acoplamiento a proteína G, desde una Gα_i a una Gα_s, que provoca la activación de la enzima adenilato ciclasa (153). También se ha descrito este fenómeno en el heterodímero de los receptores D₁ y D₂ de dopamina. El receptor D₁ está acoplado normalmente a proteína Gα_s, mientras que el receptor D₂ está acoplado a proteína Gα_i. En cambio, cuando se forma el heterodímero entre ambos receptores este nuevo complejo se acopla a proteína Gα_q (154).

Entender la complejidad de estos procesos es esencial en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas y el desarrollo de nuevos fármacos. Como ha sido mencionado con anterioridad, cerca del 40 % de los fármacos que se comercializan actualmente presentan como diana terapéutica un GPCR. Sin embargo, en el diseño de todos estos compuestos se ha tenido en cuenta únicamente a estos receptores como unidades individuales, y no como proteínas capaces de interactuar entre ellas dando lugar a complejos con propiedades distintas, que afectan tanto a la señalización celular como a la afinidad y por lo tanto a la eficacia de los ligandos. La amplia diversidad farmacológica de los oligómeros de GPCR representa una oportunidad excepcional para desarrollar nuevos tratamientos que tengan en cuenta las características de cada complejo, mejorando la selectividad y disminuyendo los efectos secundarios (155).

1.3. Receptores de cannabinoides

Los GPCR se expresan ubicuamente por todo el organismo. Sin embargo, de los cerca de 1000 receptores de esta superfamilia que han sido descritos, la distribución individual de cada uno de ellos no es homogénea. Cada tejido presenta una gran variedad de GPCR, que pueden no estar presentes en otras zonas del cuerpo, como ha podido comprobarse mediante diversos análisis de expresión y distribución. Esto indica la relevancia de este conjunto de proteínas en la regulación de una gran variedad de procesos fisiológicos y en el buen funcionamiento del organismo. Por ejemplo, cerca del 90% del total de GPCR expresados en el cuerpo se ubican en el SNC, el cual presenta una elevada complejidad tanto en su estructura como en su función y regulación, lo que nos da una idea de la

importancia que poseen los GPCR en el control de la homeostasis de los órganos que lo componen. Es esta misma complejidad la que en determinadas circunstancias es causa de numerosas enfermedades del SNC, y la que influye también en la elaboración de fármacos para la gran cantidad de enfermedades fruto de alteraciones en estos receptores.

1.3.1. Una larga historia

La planta de la marihuana, conocida también como cáñamo o por su nombre científico *Cannabis sativa*, ha sido utilizada durante milenios en medicina y actividades recreativas gracias a sus propiedades, como ha quedado registrado para la historia con la diversidad de nombres por los que ha sido conocida (Figura 12). Existen cerca de 70 compuestos denominados fitocannabinoides, presentes en esta planta (156). Ha servido de tratamiento frente al dolor, las migrañas, en obstetricia y ginecología así como en desórdenes psiquiátricos (157). En el antiguo Egipto era conocida como shemshemet, y con este nombre aparece mencionada en distintos papiros que describen tanto sus propiedades como su utilidad en la medicina de la época o la vida cotidiana. Se hacía servir en la elaboración de cuerdas y en tratamientos para diversas patologías, administrándose por distintas vías, una de ellas, en forma de ungüentos para tratar parásitos o infecciones bacterianas. Su uso también estaba extendido entre las diferentes culturas mesopotámicas como los Asirios o los Babilonios y los territorios del moderno Iraq. Era empleada por los seguidores del culto zoroastrista en la antigua Persia, y en la India aparece mencionado el uso del cannabis en los antiguos textos del *Atharva Veda*. Incluso algunos expertos creen que existen referencias a la planta del cannabis en la Biblia.

En el siglo XIX d.C se continuó utilizando el cannabis en tratamientos medicinales y se aislaron los primeros fitocannabinoides. Sin embargo, no fue hasta 1964 cuando se aisló y sintetizó por primera vez el Tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC), el principal constituyente psicoactivo de la planta de cannabis (158). Más tarde, en el año 1988, y bajo las evidencias de que debía existir un componente en el cuerpo humano capaz de interactuar con las sustancias del cannabis y mediar sus efectos, fue identificado por primera vez un receptor de cannabinoides, el receptor CB₁ (159). Este descubrimiento fue realizado mediante el uso del agonista cannabinoide sintético CP55940, que fue marcado con tritio para realizar distintos ensayos de competición. También se analizaron marcadores bioquímicos como los niveles de cAMP. Los resultados obtenidos permitieron concluir que se había detectado un nuevo receptor capaz de unir ligandos cannabinoides y producir respuestas celulares específicas. Dos años más tarde fue clonado por primera vez (160).

Una vez identificado el principal compuesto entre los fitocannabinoides, el THC, se inició la búsqueda de compuestos endógenos, denominados endocannabinoides, que actuasen como ligandos del receptor CB₁. No fue hasta el año 1992 cuando se identificó y aisló un compuesto presente en el SNC capaz de actuar como ligando endocannabinoide, al que se denominó anandamida (AEA) (161), que procede de la palabra sánscrita *ananda*, que significa paz o felicidad interna, y del término amida. Más adelante se identificaron los componentes responsables de la síntesis de este endocannabinoide así como su localización en el SNC (162). En el año 1993 habían sido

descritos muchos de los efectos del THC, entre los que destacan sus propiedades como analgésico, inmunosupresor, anticonvulsivo y antiemético. Sin embargo, no estaba claro si todos estos efectos eran producidos por la acción directa del THC sobre el receptor CB₁, o si existían otros receptores de cannabinoides capaces de interactuar con esta sustancia. Finalmente, fue identificado y clonado un nuevo receptor de cannabinoides, el receptor CB₂, al que se describió como receptor periférico (163).



Figura 12. Nombres y grafías por los que era conocida la planta del cannabis en las culturas antiguas. Extraído de Russo, 2007 (157).

1.3.2. El sistema endocannabinoide

Los receptores de cannabinoides, los compuestos endocannabinoides y sus enzimas de síntesis y degradación componen lo que se conoce como el sistema endocannabinoide (Figura 13). Este sistema juega un papel importante en el control de diversos procesos fisiológicos, tanto a nivel del SNC como en la periferia, y por lo tanto está sujeto a un estricto control. Dos de los principales ligandos endocannabinoides descritos hasta el momento son la anandamida, que como se ha comentado con anterioridad fue descubierta en el año 1992, y el 2-araquidonilglicerol (2-AG), descrito como endocannabinoide en el año 1995 (164). Las vías de síntesis de la anandamida y el 2-AG son completamente diferentes y dependientes de enzimas distintos. Estos compuestos poseen un origen lipídico, y se sintetizan según demanda a partir de lípidos de membrana en las neuronas postsinápticas. Seguidamente son liberados al espacio sináptico actuando sobre receptores expresados en la membrana presináptica, regulando la liberación de diferentes neurotransmisores como GABA (165). Una vez han ejercido su efecto sobre los receptores de cannabinoides, los ligandos son rápidamente eliminados mediante su recaptación y degradación, dando punto final a la cascada de señalización. Por lo tanto, las enzimas implicadas tanto en la síntesis, como en la recaptación y eliminación de los ligandos endocannabinoides son esenciales en la regulación de este sistema, y constituyen potenciales dianas terapéuticas en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema endocannabinoide.

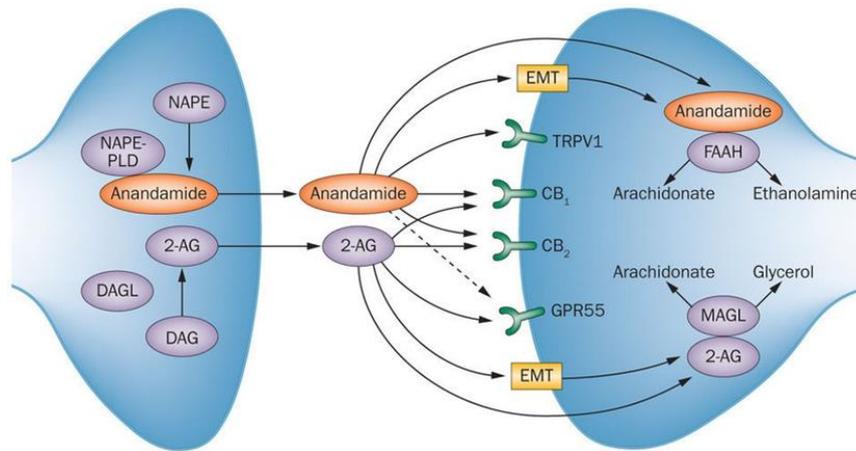


Figura 13. Esquema del conjunto de componentes del sistema endocannabinoide en una sinapsis.
 Extraído de Rudolf Schicho and Martin Storr, 2014 (166).

La presencia de anandamida ha sido demostrada tanto en el SNC como en tejidos periféricos (167). Más concretamente, en cerebro se encuentra en zonas con un elevado nivel de expresión del receptor CB_1 como el hipocampo, el cerebelo y el estriado, aunque también ha sido detectada en el tálamo, donde el receptor CB_1 se expresa poco, por lo que no parece que exista una correlación directa entre la expresión del receptor y la abundancia relativa de anandamida. A nivel periférico ha sido detectada en el bazo, el corazón y en menor proporción en el suero. Su síntesis se realiza a partir de fosfolípidos de membrana como la N-araquidil fosfatidiletanolamina (NAPE). En primer lugar, la enzima N-aciltransferasa dependiente de calcio (NAT) cataliza la transferencia de una molécula de ácido araquidónico procedente de la 1,2-sn-di-araquidilfosfatidilcolina a una fosfatidiletanolamina, dando lugar al NAPE. Posteriormente, la enzima fosfolipasa D, específica de N-araquidil fosfatidiletanolamina (NAPE-PLD), cataliza la producción de anandamida y ácido fosfatídico (168). La síntesis de anandamida también puede darse a partir de la acción de la fosfolipasa A2 de secreción, que cataliza una reacción que da lugar a 2-lyso-NAPE, que a su vez será procesado por la α , β -hidrolasa 4 para generar glicerofosfoaraquidil etanolamina, que mediante la actividad de fosfodiesterasas dará lugar a anandamida (169). Otra vía de síntesis de anandamida implica la acción de la fosfolipasa C, que hidroliza la NAPE para dar lugar a fosfoanandamida. Seguidamente, la acción de las fosfatasas producirá anandamida (170). La degradación de la anandamida se produce a través de la hidrolasa de amidas de ácidos grasos (FAAH), obteniéndose ácido araquidónico y etanolamina (171), tras ser recaptada por los transportadores de anandamida de membrana (AMT) presentes en la membrana plasmática. El mecanismo por el que los endocannabinoides son recaptados ha sido motivo de debate. Inicialmente se consideró que al ser compuestos de origen lipídico podrían difundir a través de la membrana plasmática. Finalmente, la anandamida también puede ser metabolizada por las enzimas COX-2 y lipooxigenasa (LOX) así como por el citocromo P450.

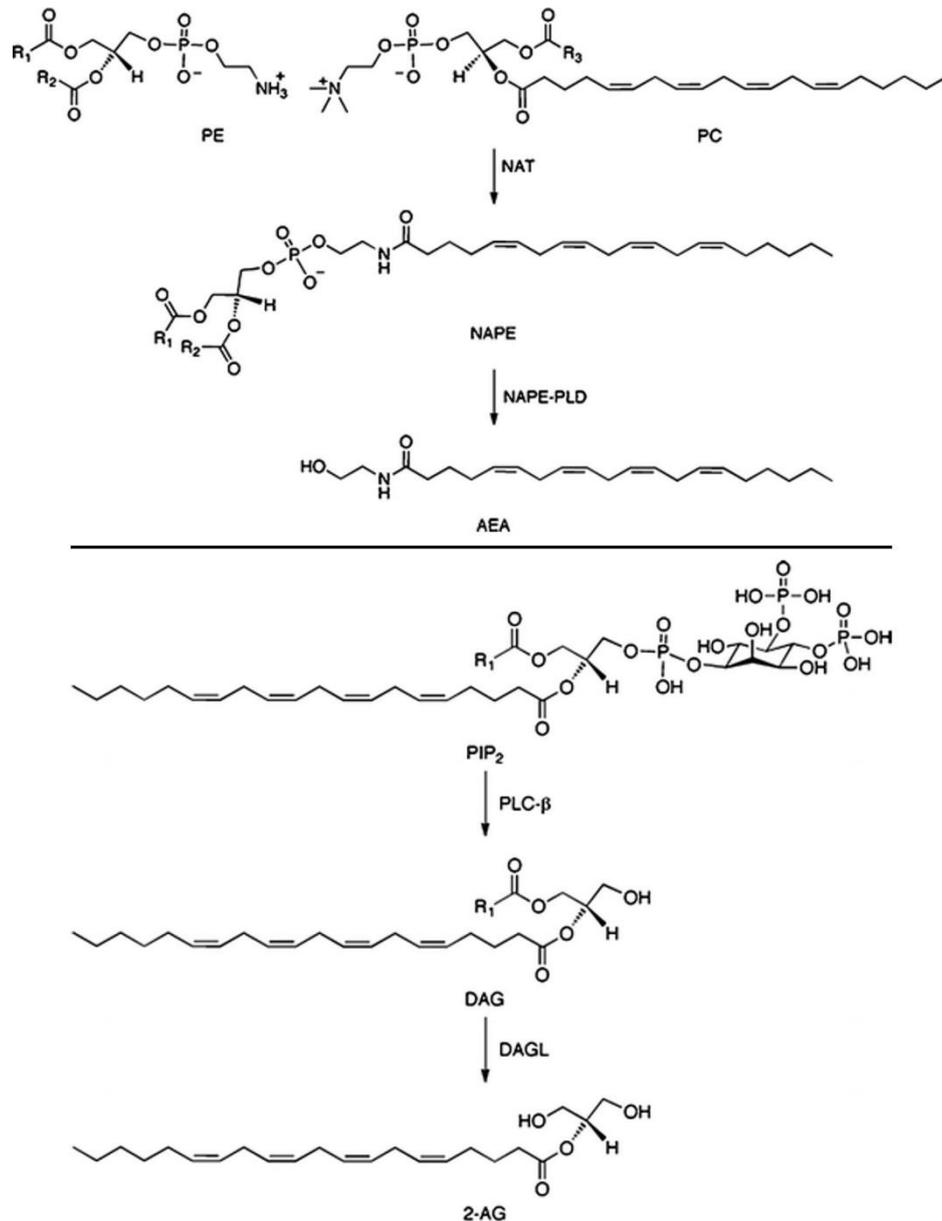


Figura 14. Proceso de síntesis de la anandamida y 2-Araquidonilgliceról a partir de lípidos de la membrana plasmática. Extraído de Daniel J. Hermanson & Lawrence J. Marnett, 2011 (172).

El 2-AG está presente en el cerebro, con una concentración 200 veces superior a la de la anandamida (173). La distribución de este compuesto es similar a la de la anandamida, con altas concentraciones en tronco encefálico, sistema límbico, estriado e hipocampo, y bajas en corteza, hipotálamo o cerebelo. En el sistema nervioso periférico ha sido descrito en el nervio ciático y en regiones lumbares de la médula espinal. No ha sido demostrada ninguna correlación entre la distribución del ligando y la expresión del receptor CB₁, al igual que con la anandamida. El 2-AG puede ser sintetizado por dos vías distintas. La primera de ellas implica la síntesis de diacilglicerol (DAG) a partir de la hidrólisis de fosfolípidos de membrana, proceso catalizado por la fosfolipasa C (PLC). Posteriormente la acción de la enzima diacilglicerol lipasa (DAGL) producirá 2-AG. La síntesis de DAG requiere la hidrólisis de ácido fosfatídico por medio de una fosfatasa dependiente de iones Mg²⁺ y Ca²⁺. La segunda vía de síntesis de 2-AG requiere la producción de fosfatidilinositol, proceso mediado por la fosfolipasa A1

(PLA1) que da lugar a lisofosfatidilinositol, el cual a su vez es hidrolizado por la lisofosfolipasa C produciendo 2-AG. También es posible que el 2-AG sea sintetizado desde el ácido 2-araquidonil lisofosfatídico (LPA) por acción de fosfatasa (174). Finalmente, el 2-AG es recaptado por el AMT presente en la membrana plasmática (175) y posteriormente es degradado por la Monoacilglicerol lipasa (MAGL) (176). La FAAH también es capaz de metabolizar el 2-AG (177). En último lugar, también puede ser eliminado por acción de la enzima COX-2, que da lugar a una forma oxigenada del 2-AG de la que todavía no se ha determinado cuál es su función exacta.

Diversos procesos están sometidos a la regulación mediada por el sistema endocannabinoide, y consecuentemente, existen distintas enfermedades que cursan con alteraciones en el mismo. Actualmente se han descrito numerosos compuestos que actúan tanto como agonistas como antagonistas de los receptores CB₁ y CB₂ de cannabinoides y que han sido empleados en la investigación del sistema endocannabinoide. Algunos de ellos son compuestos endocannabinoides como la anandamida y el 2-AG, o fitocannabinoides procedentes del *Cannabis sativa* como el THC. Otros, sin embargo, son cannabinoides de origen sintético que emulan los efectos de los fitocannabinoides y que son empleados normalmente en investigaciones sobre el sistema endocannabinoide (178) (Tabla 1).

Cannabinoid agonists	Description	K _i for CB1 (nmol/L)	K _i for CB2 (nmol/L)
2-AG	CB1 and CB2 agonist	472	1400
ACEA	CB1-selective agonist	1.4	3100
AM1241	CB2-selective agonist	280	3.4
Anandamide	CB1 and CB2 agonist	89	371
CB13	Peripherally-restricted CB1 and CB2 agonist	6.1	27.9
CP55940	CB1 and CB2 agonist	3.72	2.55
HU-210	CB1 and CB2 agonist	0.061	0.52
JWH015	CB1 and CB2 agonist	383	13.8
JWH133	CB2-selective agonist	677	3.4
R-methanandamide	CB1 and CB2 agonist	20	815
THC	CB1 and CB2 agonist	53.3	75.3
WIN55, 212-2	CB1 and CB2 agonist	3.3	62.3
Cannabinoid antagonists	Description	K _i for CB1 (nmol/L)	K _i for CB2 (nmol/L)
AM251	CB1-selective antagonist	7.5	2290
AM281	CB1-selective antagonist	12	4200
AM630	CB2-selective antagonist	5200	31.2
SR141716	CB1-selective antagonist	2	>1000
SR144528	CB2-selective antagonist	400	0.6
AM6545	Peripherally-restricted CB1-selective antagonist	1.7	523

Tabla 1. Agonistas y antagonistas de los receptores CB₁ y CB₂. Extraído de Yan Lu and Hope D. Anderson, 2017 (179).

Debido a su gran presencia en SNC, los receptores de cannabinoides y el resto de los componentes del sistema endocannabinoide han sido objeto de estudio acerca de su posible papel como diana terapéutica en enfermedades neurodegenerativas. En la enfermedad de *Alzheimer* (AD), en la que se produce una neurodegeneración frontal y del hipocampo, ha sido observada la presencia de los receptores CB₁ y CB₂ en las placas

seniles depositadas durante la progresión de la enfermedad (180). También se detecta un aumento de la actividad de CB₁R durante las fases tempranas de la enfermedad, aunque luego esta situación se revierte y disminuye su expresión. Algunos ensayos llevados a cabo muestran una disminución de la actividad de la microglía inducida por las placas seniles al tratar con agonistas del receptor CB₂ (181). En el caso del receptor CB₁ existe cierta controversia sobre cuál es la estrategia más adecuada en el tratamiento de la enfermedad, puesto que hay autores que afirman que su activación afecta negativamente a los procesos de consolidación de la memoria en el cerebro. En la enfermedad de *Parkinson* (PD), parece que la actividad de CB₁R y CB₂R posee efectos contrarios. Mientras que la actividad del receptor CB₂ ejerce un efecto neuroprotector, favoreciendo la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas, CB₁R favorece la progresión de la enfermedad. Esto ha sido comprobado al tratar con antagonistas de CB₁R como rimonabant, observándose una mejora en la coordinación motora (182). Se ha propuesto que parte de los efectos beneficiosos observados en el tratamiento con endocannabinoides y la supervivencia de neuronas dopaminérgicas se deba a su efecto antioxidante. En cuanto a la enfermedad de *Huntington*, aunque no existen tratamientos curativos de esta enfermedad que cursa con pérdida de cognición y coordinación motora, sí que han sido propuestos algunos tratamientos paliativos para atenuar los síntomas de esta enfermedad neurodegenerativa. Durante la progresión de la enfermedad se produce una disminución de la expresión del receptor CB₁ en los ganglios basales y el estriado, y ciertos tratamientos farmacológicos empleando anandamida aumentan los niveles del RNA mensajero de este receptor (183). Los tratamientos sobre CB₂R están más encaminados a controlar los procesos neuroinflamatorios que cursan con la enfermedad (184).

Ha sido descrita la participación del sistema endocannabinoide en la regulación del hambre, observándose que en ratones *knock-out* para la enzima FAAH existe una tendencia clara a la obesidad, con un aumento de la concentración de anandamida en el hipotálamo, hígado e intestino delgado (179). Este sistema también está implicado en la regulación energética del organismo. Así, en ratones tratados con el antagonista de CB₁R rimonabant se produce un aumento de la termogénesis en el tejido adiposo marrón (185). Este efecto indicaría una regulación negativa del gasto energético por parte del receptor CB₁. Se han llevado a cabo tratamientos con antagonistas específicos del receptor CB₁ en tejido periférico para evitar efectos psiquiátricos adversos, y se ha observado una reducción en el apetito, una reducción de la masa corporal y un aumento en la actividad del metabolismo de ácidos grasos (186). De forma interesante, parece ser que el receptor CB₂ ejerce el efecto contrario en la regulación del apetito y el metabolismo energético, puesto que los tratamientos con antagonistas de CB₂R incrementan la ingesta de comida, mientras que el tratamiento con agonistas reduce el tamaño de los adipocitos y favorece la pérdida de masa corporal (187).

El sistema endocannabinoide también está relacionado con los procesos de inflamación, existiendo un reconocido efecto antiinflamatorio ejercido por el receptor CB₂, reduciendo los niveles de citocinas proinflamatorias (188) y afectando positivamente a procesos patológicos como la artritis reumatoide (189) o la colitis ulcerosa (190), que cursan con inflamación. También existe una importante relación de los receptores cannabinoides con procesos cancerosos, considerándose signo de malignidad una elevada expresión de los receptores CB₁ y CB₂ en tumores (191) (192).

La expresión de estos dos receptores favorece además la apoptosis celular. Así, tratamientos con agonistas de ambos receptores reducen el tamaño de las masas tumorales. El control de procesos inflamatorios vía receptores de cannabinoides ha sido investigado en el contexto de enfermedades como la esclerosis múltiple. En esta enfermedad se produce la pérdida del recubrimiento de mielina de las terminaciones nerviosas debido a un ataque autoinmune. Además, las células de la microglía producen citocinas proinflamatorias como IL-12 que inducen la inflamación, favoreciendo la progresión de la patología. Ha sido demostrado que la activación del receptor CB₂ con anandamida reduce precisamente la expresión de esta citocina a través de la activación de la vía de las MAPK y JNK. La inhibición de la MAGL retrasa también el avance del proceso inflamatorio, al disminuir la degradación del endocannabinoide anandamida y favorecerse la actividad del receptor CB₂. Finalmente, se constató también un aumento de la concentración de anandamida en pacientes de esta enfermedad (193) (180).

Los derivados cannabinoides han sido ampliamente utilizados en la inhibición de la emesis. El proceso implica a los receptores CB₁ existentes en la periferia, que inhiben la activación de los receptores de serotonina 5-HT, suprimiendo la liberación de serotonina en respuesta a sustancias extrañas en el tracto digestivo (194). Otra propiedad conocida es el efecto analgésico. Cuando se produce una agresión que genera dolor en el organismo, tiene lugar una desregulación del sistema endocannabinoide a nivel central y periférico. En concreto, se ha detectado un aumento de la concentración de anandamida en SNC, que regula el dolor vía CB₁R (195). A nivel periférico el receptor CB₁ inhibe la transmisión nerviosa de las señales de dolor (196), mientras que el receptor CB₂ jugaría un papel importante reduciendo los niveles de citocinas proinflamatorias que aumentan la sensibilidad al dolor y a su vez inhibiendo la producción de neurotransmisores.

El sistema endocannabinoide también tiene un rol importante en el sistema cardiovascular. Ha sido estudiado el efecto de compuestos como el THC en la presión sanguínea, observándose la inducción de hipotensión y bradicardia prolongada tardía (197). Por el contrario, uno de los primeros síntomas tras el consumo de cannabis es el aumento de la frecuencia cardíaca, situación que mejora tras tratamientos con rimonabant, el antagonista de CB₁R (198). También se cree que el receptor CB₁ induce la liberación de óxido nítrico en los vasos sanguíneos, lo cual provoca una dilatación de los mismos (199). Ambos receptores cannabinoides, CB₁ y CB₂, parecen jugar también un interesante papel retrasando la formación de placas de ateroma. El bloqueo del receptor CB₁ y la potenciación del receptor CB₂ influyen en el proceso. Ha sido detectada una mayor expresión de CB₂R en regiones ateroscleróticas, donde el bloqueo del receptor CB₂ potencia la formación de placas (200). Además, la activación del receptor CB₂ disminuye la expresión de moléculas de adhesión y mediadores proinflamatorios. Por otro lado, el receptor CB₁ favorece la formación de placas de ateroma, regulando el flujo de colesterol vía macrófagos y favoreciendo la migración de células musculares lisas a los vasos sanguíneos (201).

Tanto CB₁R como CB₂R parecen estar implicados en la regulación de la función mitocondrial. CB₁R ha sido encontrado en la membrana de mitocondrias procedentes de ratón (202), y su activación regula negativamente los componentes I y II de la cadena transportadora de electrones (203), afectando también a la morfología y el tamaño de las mitocondrias así como a su consumo de oxígeno en músculo, hígado, y tejido adiposo

blanco. Por el contrario, el antagonismo del receptor CB₁ muestra efectos opuestos (204). En cuanto a CB₂R, este receptor posee un efecto contrario al del receptor CB₁ en mitocondrias, regulando negativamente los procesos apoptóticos mitocondriales y ejerciendo un papel protector en situaciones de isquemia (205).

Los estados de ánimo están sometidos también al control del sistema endocannabinoide. De hecho, es conocido el efecto ansiolítico del cannabis, y por supuesto, su efecto psicoactivo, ejercido principalmente por el THC mediante la activación del receptor CB₁. El estudio de la implicación de este sistema en los efectos observados del consumo de marihuana muestra una actividad dual de los compuestos cannabinoides. El análisis de concentraciones bajas y altas de los compuestos cannabinoides se contraponen, y además varía según las regiones cerebrales estudiadas. A dosis bajas, el THC presenta efectos ansiolíticos cuando es inyectado en la corteza prefrontal, mientras que a dosis elevadas produce justo el efecto contrario en esta región. En cambio, la inyección de THC en la amígdala basolateral a bajas concentraciones produce efectos ansiogénicos, mientras que las altas concentraciones no producen efectos significativos (206). También se ha observado una influencia del sistema endocannabinoide en los estados de ánimo como efecto secundario de los tratamientos frente a la obesidad. El antagonismo de CB₁R con rimonabant produjo un efecto secundario muy negativo en los pacientes obesos, dando lugar a cuadros depresivos con riesgo de suicidio (207). Otro proceso en el que está implicado el sistema endocannabinoide es la regulación de la calidad del sueño. Existen tratamientos orientados a incrementar la concentración de endocannabinoides como la anandamida que han mostrado ser eficaces en la mejora de la calidad del sueño, afectando a la duración del mismo e incrementando el número de fases REM (208).

Teniendo en cuenta la cantidad de procesos en los que se ven envueltos los componentes del sistema endocannabinoide, el desarrollo de tratamientos farmacológicos que posean como dianas terapéuticas a cualquiera de los componentes de este sistema parece esencial en el control tanto de funciones metabólicas, la analgesia, el devenir de enfermedades neurodegenerativas o incluso en la prevención de riesgos vasculares.

1.3.3. Receptor CB₁

El receptor CB₁ forma parte de la familia A de receptores acoplados a proteína G, y como tal, consta de un dominio amino terminal extracelular, siete dominios transmembrana con sus respectivos bucles extracelulares e intracelulares y un dominio carboxilo terminal. Es codificado por el gen CNR1, que se encuentra en el brazo largo del cromosoma 6 en el ser humano. Como su propio nombre indica es el primer receptor de cannabinoides en ser descubierto. Fue descrito en el año 1988 ante las abrumadoras evidencias de que debía existir un receptor en el SNC capaz de interactuar con los principios activos de la marihuana. Posteriormente en el año 1990 fue clonado por primera vez.

El receptor CB₁ se expresa en abundancia en el cerebro, siendo el receptor GPCR más abundante en este tejido, a excepción de los centros respiratorios cerebrales. Ha sido detectado en regiones como el hipocampo, la corteza cerebral, los ganglios basales y el

cerebelo. También se ha demostrado su presencia en tejidos periféricos como el bazo, los pulmones, el timo, el corazón y el sistema vascular (209) (210). Tanto la anandamida como el 2-AG anteriormente descritos actúan como ligandos endocannabinoides del receptor CB₁, siendo una de sus principales funciones la de regular la neurotransmisión GABAérgica y glutamatérgica, aunque también tienen un importante efecto en la inhibición de la síntesis de neurotransmisores (211) (212) (213). El receptor CB₁ puede ser activado por el THC, el principal componente psicoactivo del cannabis. Se han llevado a cabo numerosas investigaciones farmacológicas sobre este receptor debido a los más que conocidos efectos del consumo de marihuana en la medicina tradicional, además de ser una interesante diana farmacológica no opioide en el desarrollo de analgésicos. Sin embargo, numerosos ensayos han mostrado efectos secundarios debido a las propiedades psicoactivas de algunos compuestos que también han provocado afectación de la memoria y disfunción cognitiva en algún caso.

El receptor CB₁ está acoplado a proteína Gα_i (214) (215), y parece que interactúa con ella a través del dominio IL3 y de la región yuxtamembrana del dominio carboxilo terminal, que va desde el dominio TM7 hasta la región de palmitoilación del receptor (216). El receptor CB₁ contiene una hélice 8 característica, que presenta aminoácidos hidrofóbicos orientados hacia la membrana plasmática que favorecen el anclaje a membrana del receptor, y aminoácidos con carga positiva encarados hacia la proteína Gα_i que aumentan la eficacia de los ligandos (217) (218). La hélice 8 del receptor CB₁ parece jugar un importante papel en la activación de la proteína Gi (217). La activación del receptor da como resultado la regulación negativa de la enzima adenilato ciclasa, (AC), debido a una menor activación de la PKA, responsable de regular la actividad de la AC. Consecuentemente, se produce una reducción en los niveles de cAMP intracelulares. Se ha comprobado que en presencia de la toxina *pertussis*, que bloquea el acoplamiento a proteína Gi, es posible que el receptor CB₁ se acople a proteína Gs (219). En regiones como el globo pálido se ha observado que el receptor CB₁ puede provocar aumentos en los niveles de cAMP intracelular, tal vez a través de la activación de las isoformas 2, 4 y 7 de la AC por medio dímero βγ (220), aunque también se ha especulado sobre si el proceso está mediado por el secuestro de proteínas Gα_i por parte de otros receptores como los D₂ de dopamina, favoreciéndose así el acoplamiento a la proteína Gs (221).

Al igual que en otros GPCR, la activación del receptor CB₁ provoca un cambio conformacional en la proteína Gα_i que da lugar a la separación de la proteína G en dos subunidades. El dímero βγ de la proteína G es responsable de la activación de la vía de las MAPK. Las MAPK también pueden ser activadas por medio de la interacción del receptor con proteínas β-arrestina a través del fenómeno de la transactivación (222). Parece ser que la activación de las MAPK por el receptor CB₁ es distinta según el tipo celular en el que se exprese. Por ejemplo, en astrocitos, la activación de la vía de las MAPK implica la activación de la quinasa PI3K, mientras que en neuronas hipocampales el proceso parece implicar preferentemente la activación de MEK provocada por la regulación negativa de la PKA e independientemente de la actividad de PI3K (223). La actividad del dímero βγ también está involucrada en la inactivación de canales de Ca²⁺, como ha podido comprobarse al estudiar corrientes de calcio intracelulares reconstituidas en presencia del antagonista de CB₁R, rimonabant (224). La actividad del dímero βγ también es capaz de activar canales rectificadores de K⁺.

Se ha descrito que la activación del receptor CB₁ puede aumentar los niveles de óxido nítrico (NO) intracelulares a través de la enzima óxido nítrico sintasa neuronal y la enzima óxido nítrico sintasa endotelial. Este efecto se observó en vasos sanguíneos como capilares y determinadas regiones de la vena safena, así como en células endoteliales y monocitos (225) (226). La activación del receptor CB₁ también puede producir el efecto contrario, es decir, reducir la producción de NO. Este fenómeno ocurre a través de la inhibición de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje en células granulares cerebelares (227).

Al igual que otros GPCR, el receptor CB₁ interactúa con un gran número de proteínas de las que depende tanto su señalización como su tráfico celular (Tabla 2). La activación del receptor CB₁, además de provocar el intercambio conformacional de la proteína Gα_i que desemboca en la activación de distintas vías de señalización celular, también inicia la desensibilización del receptor. Para ello es necesaria la fosforilación del receptor por GRK en sitios específicos de la secuencia que permitan la interacción con las β-arrestinas. Ken Mackie y colaboradores determinaron la importancia de las secuencias de aminoácidos comprendidas entre las posiciones 418 y 439, empleando mutaciones puntuales y secuencias truncadas de la región carboxilo terminal (228). Recientemente ha sido descrito que el receptor CB₁ interactúa también con una proteína denominada *Cannabinoid Receptor Interacting Protein*, CRIP1a/b por sus siglas en inglés, a través de la región carboxilo terminal del receptor. Aunque no está clara su función, parece ser que la isoforma CRIP1a podría estar involucrada en la regulación de la señalización del receptor CB₁, mientras que la función de la isoforma CRIP1b todavía se desconoce (229).

CB1-Associated Protein	Site of CB1 interaction	Protein Trafficking	Role in Signal Transduction
Gi1	C-terminal side of Intracellular Loop 3	--	cAMP inhibition MAPK activation
Gi2	N-terminal side of Intracellular Loop 3	--	cAMP inhibition MAPK activation
Gi3 and Go	C-terminal Helix 8	--	cAMP inhibition Ca ²⁺ channel inhibition MAPK activation
Gs	C-terminal side of Intracellular Loop 3	--	cAMP stimulation
Arrestin	Mid-C-terminal tail; C-terminal distal 20 amino acids	Plasma membrane internalization	Desensitization of Kir3 Kinetics of MAPK
AP-3	Leu-Leu or Tyr signals	Late endosome budding to vesicles, or lysosomes	Gi- and ERK-associated
GASP1	C-terminal Helix 8	Targeting to lysosome	--
CRIP1a and CRIP1b	Distal C-terminal tail	--	Ca ²⁺ channel inhibition
FAN	Mid-C-terminal tail	--	eramide-mediated Raf1-MEK-ERK; stimulation of metabolic processes

Tabla 2. Proteínas con las que interacciona el receptor CB₁ y sus funciones en la señalización. Extraído de Allyn C. Howlett, Lawrence C. Blume and George D. Dalton 2010 (230).

Además de interactuar con proteínas intracelulares, ha sido demostrada la capacidad del receptor CB₁ de formar homodímeros y heterodímeros con otros receptores, lo cual multiplica la ya de por sí compleja farmacología de este receptor (231). El homodímero CB₁R/CB₁R fue descrito en el año 2002 mediante el uso de anticuerpos específicos del dímero y la técnica de *western-blot* y se determinó la importancia de la región carboxilo terminal en esta interacción (232). El sentido de la existencia de este homodímero ha llevado a los investigadores a preguntarse si el receptor CB₁ existe únicamente formando complejos diméricos en la célula. Recientemente, ha sido descrita la existencia de heterodímeros funcionales de los receptores CB₁/CB₂ y la existencia de estos en el cerebro. La formación de este complejo afecta la señalización de ambos receptores, dando lugar a fenómenos de *cross-talk* negativo entre los receptores CB₁ y CB₂ cuando son coactivados con agonistas específicos de ambos. También ha sido demostrada la existencia de un fenómeno de *cross*-antagonismo. Es decir, que los antagonistas del receptor CB₁ pueden bloquear el efecto de los agonistas del receptor CB₂ y viceversa (233). También ha sido descrito el heterodímero del receptor CB₁ con el que se especula que puede ser el futuro receptor CB₃, el receptor huérfano GPR55. Se ha descrito la existencia de un efecto de *cross*-antagonismo entre los receptores que forman el heterodímero CB₁R/GPR55 (234).

1.3.4. Receptor CB₂

El receptor CB₂, al igual que su hermano CB₁R, forma parte de la familia A de receptores GPCR, y presenta las mismas características estructurales que el resto de los miembros de la familia. Fue descrito y clonado por primera vez en el año 1993 como un receptor cannabinoide periférico, presente en células del sistema inmune y hematopoyéticas, así como en otros tejidos ajenos al SNC (235). Sin embargo, más recientemente, aunque algunos autores siguen manifestando sus dudas, se ha demostrado su existencia en el SNC, más concretamente, en microglía de cerebelo, en neuronas presinápticas de hipocampo, corteza y otras regiones aunque con una expresión menor que la del receptor CB₁ (Tabla 3) (236) (237) (238) (239) (240). El receptor CB₂ está codificado por el gen CNR2, que se encuentra en el brazo corto del cromosoma 1, y presenta una homología de secuencia con CB₁R cercana al 50% (209). Al igual que CB₁R, los principales ligandos endocannabinoides de este receptor son la anandamida y el 2-AG, aunque parece que el primero presenta una mayor selectividad por el receptor CB₁. También es capaz de unir y de ser activado por THC. CB₂R también está acoplado a proteína G α_i , por lo que el resultado de la activación del receptor es una regulación negativa de la actividad de la AC, y por lo tanto una reducción en los niveles de cAMP intracelulares. También es capaz de activar la vía de las MAPK a través del dímero $\beta\gamma$ de la proteína G. Sin embargo, el receptor CB₂ no modula canales rectificadores de potasio ni canales de calcio (241).

Debido a la similitud en la farmacología de ambos receptores fue necesario desarrollar agonistas sintéticos específicos para el receptor CB₂, como el compuesto JWH015 o el compuesto JWH133, que hiciesen posible evaluar la señalización de este receptor en tejidos en los que también se expresa el receptor CB₁ (243). A nivel estructural, han sido demostradas diferencias entre ambos receptores que determinan la selectividad de los ligandos propios de ambos. Por ejemplo, la secuencia de

aminoácidos entre las regiones TM4, EC2 y TM5 parece ejercer cierta influencia en la especificidad de los antagonistas de CB₁R y CB₂R SR141716A y SR144528 (244). También se ha observado en experimentos de mutagénesis de ambos receptores que la fenilalanina de la posición 197 de la secuencia aminoacídica del receptor CB₂ es esencial en la especificidad del ligando WIN55,212-2 (245). Cabe destacar la importancia que posee el aspartato de la posición 163 del receptor CB₁ y de la posición 80 del receptor CB₂, que afecta directamente a la interacción con la proteína G α_i y la transducción de las señales hacia el interior de la célula, y por lo tanto a la eficacia del ligando (246).

El receptor CB₂ también interacciona con un gran número de proteínas intracelulares, y al igual que el receptor CB₁ puede formar complejos con otros receptores. Como ya se ha mencionado con anterioridad, existen evidencias de la formación de heterodímeros de los receptores CB₁ Y CB₂, pero también ha sido descrito el heterodímero de receptores CB₂ y GPR55. La formación de este oligómero modula la señalización de ambos receptores dando lugar a fenómenos de *cross-talk* negativo entre los dos receptores. La presencia del receptor CB₂ afecta a la activación de factores de transcripción inducidos por GPR55 cuando este es activado por su propio agonista, y también se ve afectada la activación de la vía de las MAPK. La presencia de GPR55 modula a su vez la actividad del receptor CB₂, afectando a su señalización cuando es tratado con su agonistas específicos (68).

Location	Presence	Detection method	Species
Whole brain	Present	ISH/NB/RT-PCR/WB	Mouse/Rat/Human
Brainstem	Present	IHC/ICC/RT-PCR/WB	Mouse/Rat/Human
Cerebellum	Present	IHC/ISH/ICC/RT-PCR/WB/NB	Mouse/Rat/Human
Cortex	Present	IHC/NB/RT-PCR	Mouse/Rat/Human
Hippocampus	Present	IHC/RT-PCR	Mouse/Rat/Human
Peripheral neurons/spinal cord	Present	IHC/ISH/ICC/RT-PCR/WB/NB	Mouse/Rat/Human/G. pig
Neural progenitor cells	Present	ICC/RT-PCR/WB	Mouse/Rat/Human

Tabla 3. Distribución del receptor CB₂ en el SNC y el SNP. Resumen extraído de Brady K Atwood and Ken Mackie, 2010 (242).

1.3.5. Receptor GPR55

GPR55 fue identificado en el año 1999 junto con otros dos receptores, GPR52 y GPR53, en un estudio en el que se extrajeron secuencias de distintas bases de datos con el objetivo de identificar nuevos receptores en el genoma humano que en esos momentos estaba siendo descifrado (247). Los investigadores determinaron que la secuencia del gen que codifica para este receptor, denominado también GPR55, se

encuentra en el brazo largo del cromosoma 2, carece de intrones, y además se expresa ubicuamente en el cerebro, así como en tejido adiposo, testículos y bazo. El receptor GPR55 pertenece a la familia A de receptores GPCR. Hasta hace poco formaba parte de los denominados receptores huérfanos. A pesar de haberse descrito su ligando endógeno y su proximidad a los receptores de cannabinoides, este receptor ha permanecido en el limbo desde su descubrimiento, aunque cada vez más autores creen que debería ser considerado como un receptor con identidad propia dentro de la familia de receptores cannabinoides.

Posteriormente a su descubrimiento se iniciaron estudios sobre este receptor, que rápidamente llevaron a pensar que podría tratarse de un nuevo receptor de cannabinoides, el CB₃. Debido a la complejidad en la señalización del sistema endocannabinoide, se especulaba que debía existir un receptor de cannabinoides no descrito que fuese responsable junto con CB₁R y CB₂R de dicha señalización pleiotrópica. Después de la realización de sólidos ensayos, se llegó a la conclusión de que GPR55 podría ser el candidato ideal, puesto que es capaz de interactuar con ligandos tanto endógenos como exógenos de los receptores de cannabinoides, a pesar de la baja homología con los receptores CB₁ y CB₂, que se aproxima tan solo al 15%. Precisamente es esta baja identidad de secuencia con los receptores de cannabinoides lo que ha ayudado a mantener a GPR55 fuera de la familia. Ha sido demostrado, sin embargo, que GPR55 es capaz de unir compuestos como el THC, la anandamida y el 2-AG, y compuestos sintéticos como el CP55940, el O1602 y los antagonistas rimonabant y AM251, que de manera interesante, actúan como agonistas de GPR55 (248). A pesar de este hecho, y debido a la falta de evidencias que demuestren que este receptor sea específico para compuestos cannabinoides, se pensó que GPR55 debía tener algún tipo de ligando endógeno. Así, en el año 2007 se descubrió que era capaz de unir el compuesto lisofosfatidilinositol (LPI) como ligando propio (249). En este estudio se llevaron a cabo ensayos de funcionalidad del receptor en presencia de distintas sustancias, entre ellas el LPI y aquellos compuestos cannabinoides que hasta el momento se consideraba que podían unirse al receptor GPR55, y se llegó a la conclusión de que solo el LPI era capaz de producir una activación eficaz de la vía de las MAPK, observándose un aumento rápido de las proteínas ERK1/2 fosforiladas. También se observó que el LPI inducía movimientos de Ca²⁺ intracelular por medio de la activación de GPR55. Este último dato daba una pista de la clase de proteína G que acoplaba el receptor, que posteriormente se describió como una proteína G α_{13} (250) (251) (Figura 15).

Existe controversia acerca de las respuestas generadas por la unión de ligandos cannabinoides al receptor GPR55 y sobre la enorme cantidad de compuestos que se ha registrado que actúan sobre este receptor (Tabla 4). Este disperso resultado puede deberse, por ejemplo, a diferencias en la metodología empleada o al tipo celular escogido. Algunos autores han observado la unión del endocannabinoide endógeno 2-AG al receptor GPR55, pero no parece que esto induzca cambios significativos ni en el reclutamiento de β -arrestinas ni en la internalización del receptor como respuesta a la activación por agonista (252). La anandamida también es capaz de unirse al receptor GPR55, pero de nuevo los resultados observados no permiten afirmar que la anandamida sea un ligando endógeno del receptor GPR55, puesto que tampoco parece capaz de inducir la activación de la vía de las MAPK ni el reclutamiento de β -arrestinas

(253). El THC, principal componente psicoactivo de la marihuana también es capaz de unirse al receptor GPR55, provocando la movilización de Ca^{2+} pero sin ejercer ningún efecto en la vía de las MAPK. Por otro lado, algunos compuestos como el Cannabidiol parecen ejercer un efecto antagónico sobre GPR55 (254). Ligandos sintéticos como el CP55940 o el Abnormal-Cannabidiol (ABN-Cannabidiol), o los antagonistas cannabinoides rimonabant y AM251 exhiben una señalización desconcertante. Mientras que el primero parece actuar como antagonista del receptor GPR55, el ABN-Cannabidiol ha sido descrito tanto como antagonista como agonista. Por otro lado, los dos antagonistas cannabinoides mencionados han sido descritos principalmente como agonistas del receptor GPR55, aunque otros autores indican que el rimonabant actúa como antagonista (255). La complejidad en la señalización del receptor GPR55, así como la coexistencia de este en tejidos del SNC con los receptores de cannabinoides, o los múltiples procesos en los que parece verse involucrado, lo han convertido en una interesante diana terapéutica. Este interés por caracterizar la farmacología del receptor GPR55 ha llevado a descubrir nuevos ligandos endógenos, como el 2-Araquidonil-sn-glicero-3-fosfoinositol (2-AGPI), que ha demostrado ser un potente activador de las vías inducidas por GPR55 (256). Técnicas como la *dinamic mass redistribution* (DRM) y *AlphaScreen SureFire Assay* han sido empleadas también en estudios recientes en la búsqueda de compuestos sintéticos que actúen como agonistas y antagonistas del receptor, ampliando así la biblioteca de compuestos que pueden servir como herramienta en futuras investigaciones sobre GPR55 (257) (258) (259). De hecho, gracias a esta clase de estudios, recientemente se describió un nuevo ligando endógeno de GPR55, la N-Araquidonil glicina (260).

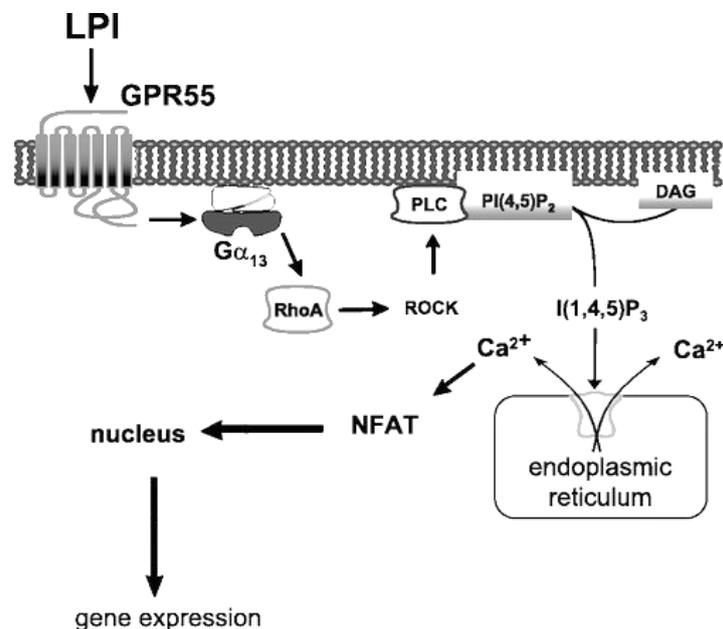


Figura 15. Cascada de señalización inducida por la activación de GPR55 al unir su agonista endógeno LPI. La activación del receptor GPR55 por su ligando LPI da como resultado la activación de la proteína $\text{G}\alpha_{13}$. Esto provoca la liberación del Ca^{2+} de los reservorios intracelulares, concretamente del Retículo Endoplasmático (RE). El proceso implica la activación de la proteína RhoA, que es capaz de activar a la quinasa ROCK, responsable de la activación de la PLC, que a partir de lípidos de membrana sintetizará IP₃, provocando la liberación de iones Ca^{2+} del interior del RE. La fosfatasa calcineurina es activada por este ión, tras lo cual desfosforila al factor de transcripción NFAT, lo que en última instancia provocará la transcripción de genes. Por otro lado, la actividad del dímero $\beta\gamma$ es responsable de la activación de la vía de las MAPK. Extraído de Christopher M. Henstridge et al., 2009 (251).

En humanos, se ha descrito la importancia de GPR55 en la regulación del metabolismo (261), con una fuerte implicación en el control del peso corporal. También se ha relacionado una mayor expresión de GPR55 en tejido adiposo visceral, así como niveles elevados de LPI circulante con la obesidad (262). Existe un polimorfismo en este receptor que afecta a la glicina en la posición 195 de la secuencia aminoacídica, siendo sustituida por una valina; esta nueva isoforma se encuentra relacionada con un patrón de anorexia nerviosa (263). En páncreas, GPR55 se expresa en los islotes pancreáticos y regula la liberación de insulina por medio de la activación con LPI (264).

La actividad de este receptor también ha sido relacionada con el cáncer. En ciertos tipos de cáncer de mama, como el triple negativo para el receptor de estrógenos, progesterona y el receptor HER₂, la actividad de GPR55 se relaciona con una mayor malignidad, favoreciendo la metástasis. Esto lo convierte en una interesante diana en el tratamiento de este tipo de cáncer (265). Se ha observado que algunos tumores producen LPI, que podría estar actuando como ligando autocrino, favoreciendo la proliferación de las células cancerosas y por lo tanto promoviendo el avance de la enfermedad. En mujeres con cáncer de ovario, la expresión de GPR55 también se relaciona con una mayor malignidad (266). Esta propiedad no es exclusiva de este tipo de cánceres. En general, la elevada expresión de GPR55 se relaciona con un peor pronóstico. Esto es debido a que GPR55 promueve la proliferación celular a través de la activación de la vía de las MAPK (267).

Más recientemente, GPR55 ha sido relacionado con la regulación de la inflamación y el dolor neuropático (269). A nivel de tracto gastrointestinal, el receptor GPR55 parece estar implicado en el control del peristaltismo y en la regulación de procesos inflamatorios (270). En estudios de inflamación intestinal en ratones *wild-type* y K.O. se ha observado que el receptor GPR55 promueve la inflamación intestinal. Los ratones tratados con el antagonista de GPR55 CID16020046 mostraron una evolución favorable a la inflamación, mientras que los ratones K.O. para el receptor mostraron niveles más bajos de inflamación, y además la proporción de leucocitos y citocinas proinflamatorias era menor que en los animales *wild-type* (271). En ratones K.O. para GPR55 no se producen fenómenos de hiperalgesia en respuesta a estímulos mecánicos, lo que parece indicar que el receptor actúa como un promotor nociceptivo importante en la sensibilidad al dolor. Sin embargo, un estudio reciente con ratones *wild-type* y K.O. en el que se sometió a los animales a distintos estímulos de calor, frío y mecánicos, así como a procesos inflamatorios no mostró diferencias entre ambos grupos, lo que hace cuestionarse si realmente el receptor GPR55 juega un papel diferencial en este tipo de procesos de la misma manera que los receptores de cannabinoides (269).

GPR55 también se expresa en el SNC, y a este nivel algunos autores lo han señalado como una posible diana terapéutica en enfermedades neurodegenerativas. La expresión del receptor en estriado ha sido relacionada con el control motor, y ha sido corroborado en ratones K.O. para el receptor GPR55 que cursan con alteraciones en el movimiento (272). Por lo tanto, en la enfermedad de *Parkinson*, GPR55 podría ser una interesante diana en el tratamiento o en la disminución de la progresión de la enfermedad. Un estudio reciente ha demostrado la expresión del receptor en regiones relacionadas con el control del movimiento como el globo pálido, el estriado y la sustancia *nigra*, encontrando niveles de expresión de GPR55 reducidos en dichas regiones en los animales en los que se ha inducido la enfermedad de *Parkinson*. El tratamiento con el

compuesto Abnormal-Cannabidiol (ABN-CBD), supuesto agonista del receptor GPR55, parece producir una mejora significativa en las alteraciones motoras de la enfermedad de *Parkinson*, previniendo también la inducción de catalepsia (273). GPR55 juega un papel importante en el SNC en el crecimiento axonal y como diana en la inervación. Por ejemplo, durante el desarrollo de la retina, GPR55 está implicado en el crecimiento del cono axonal de las células ganglionares de la retina y en la formación de filopodios, además de ejercer un efecto quimioatrayente de las prolongaciones de las células ganglionares vecinas al ser activado (274).

Agonistas cannabinoides de GPR55	Antagonistas cannabinoides de GPR55	Agonistas no cannabinoides de GPR55	Antagonistas no cannabinoides de GPR55
2-AG	CBD	LPI	CID23612552ML191
CBD	SR141716A	2-AGPI	CID1434953ML192
ABN-CBD	CP55940	CID1792197	CID1261822ML193
O-1602		CID1172084	CID16020046
WIN55, 212-2		CID2440433	
Δ^9 -THC		CID1135734	
AEA		GSK494581A	
SR141716A			
AM251			

Tabla 4. Listado de algunos de los ligandos de GPR55 tal y como se los ha descrito en diversos estudios. Extraído de Shore and Reggio, 2015 (268).

1.3.6. Otros posibles receptores cannabinoides

Aunque oficialmente por el momento solo existen dos receptores de cannabinoides, y un sospechoso habitual, el receptor GPR55, investigaciones recientes en receptores huérfanos han llevado a concluir que pueden existir otros receptores cannabinoides, o por lo menos receptores relacionados con el sistema endocannabinoide capaces de interactuar con componentes de este. De nuevo, la complejidad en la señalización y regulación del sistema endocannabinoide hace pensar en nuevos actores que formen parte de esta compleja trama, como es el caso de los receptores TRPV₁, GPR18 y GPR119.

El receptor de potencial transitorio V₁, o TRPV₁ por sus siglas en inglés, forma parte de un conjunto de canales iónicos no selectivos y se encuentra presente tanto en neuronas del Sistema nervioso central como del Sistema nervioso periférico, y en células no nerviosas (275) (276). Este canal es activado por compuestos de origen vaniloide, es decir, sustancias que presentan en su estructura un grupo vanílico, como la capsaicina. También puede ser activado por interacción con sustancias ácidas, frío y calor. La activación de este receptor da lugar a sensaciones dolorosas, como en el caso de la

angina de pecho, donde la isquemia causa acidificación de los fluidos en el lugar del ataque, activando al TRPV₁ y generando el característico dolor de la angina de pecho (277). Ha sido descrito que tanto la anandamida como el compuesto sintético ACEA son capaces de activar este receptor, aunque a concentraciones unas 10 veces superiores a las necesarias para activar al receptor CB₁. La activación de TRPV₁ estimula la producción de más anandamida, y la propia actividad del receptor CB₁ parece dar como resultado la activación del receptor TRPV₁ (278).

El receptor GPR18 se expresa en el bazo, el tronco encefálico, los testículos y otros tejidos (279) (280). Ha sido descrito que la N-araquidonil glicina (NAGly) actúa como ligando endógeno de este receptor, aunque recientemente algunos autores cuestionan la capacidad de responder a este compuesto por parte de GPR18 y si debería considerarse a este receptor como un receptor de NAGly (281). Además, el THC y el ABN-CBD parecen capaces de activar a GPR18 actuando como agonistas selectivos. Por otro lado, el compuesto sintético O-1918, análogo del Cannabidiol, ejerce un efecto antagónico sobre el receptor (282) (283). GPR18 se encuentra acoplado a proteína G α_i , y su activación da como resultado la inhibición de la AC con la correspondiente reducción en los niveles de cAMP (284). También es capaz de activar la vía de las MAPK así como la señalización vía PI3K/Akt (285). Estudios recientes apuntan a que algunas de las discrepancias observadas en las respuestas inducidas por la activación del receptor GPR18 podrían deberse al fenómeno conocido como *biased agonism*, de tal forma que compuestos diferentes darían lugar a respuestas celulares distintas en este receptor (286). Se ha relacionado la activación de GPR18 con la regulación de la presión sanguínea a través de la producción de NO. La activación del receptor incrementa la producción de anandamida a través de la inhibición de la FAAH (287), y así, potencia la activación del receptor CB₁, que como se ha descrito anteriormente está relacionado con el control de la presión sanguínea a través de la síntesis de NO, aumentándola. También juega un papel importante disminuyendo la presión intraocular en los ciclos día/noche (288).

GPR119 es otro receptor huérfano que fue identificado durante la secuenciación del genoma humano en el proyecto genoma, siendo descrito como un receptor expresado predominantemente en páncreas en células que expresan el péptido PPY y tracto gastrointestinal (289). GPR119 está acoplado a proteína G α_s , por lo que su activación induce al aumento en los niveles de cAMP por activación de la AC. Han sido descritos algunos agonistas de este receptor, como los compuestos AR231453, WO2004065380 y PSN632408. La presencia de este receptor en páncreas ha sido relacionada con la regulación del metabolismo. La activación de GPR119 promueve la síntesis del péptido similar al glucagón 1 (GLP-1) (290) y promueve la replicación y neogénesis de células β pancreáticas (291), lo que lo convierte en una interesante diana terapéutica en enfermedades relacionadas con alteraciones metabólicas como la diabetes tipo II y la obesidad (292) (293). El hecho de considerar a GPR119 como un posible receptor cannabinoide se debe a que este receptor es activado por la Oleoiletanolamida (OEA) y el 2-oleoil glicerol (2-OG), un compuesto análogo del endocannabinoide anandamida (294). Sin embargo, este receptor parece no ser sensible a agonistas endocannabinoides como la anandamida ni a agonistas sintéticos como el CP55940 o WIN55,212-2.

1.4. Sistema endocannabinoide y neuroinflamación

El término neuroinflamación hace referencia a la respuesta inflamatoria que tiene lugar en el SNC. Al igual que en la periferia, la presencia de elementos nocivos en el tejido pone en marcha la respuesta inmune, en la que intervienen diversos actores como la microglía, los astrocitos, los linfocitos y los macrófagos. El proceso neuroinflamatorio tiene como objetivo la eliminación de elementos extraños o nocivos presentes en el tejido y la reparación de este. Sin embargo, su mantenimiento a lo largo del tiempo tiene un efecto pernicioso debido a la síntesis de sustancias que poseen un efecto citotóxico, como las especies reactivas del oxígeno, el óxido nítrico y citocinas proinflamatorias como el TNF- α . En las enfermedades neurodegenerativas tienen lugar procesos neuroinflamatorios que se prolongan en el tiempo y que contribuyen a la sintomatología y el avance de la enfermedad.

En condiciones normales, la astrogliá está involucrada en el mantenimiento de la homeostasis del SNC, eliminando iones y neurotransmisores como el glutamato para evitar posibles efectos neurotóxicos, regulando la neurotransmisión. También está implicada en el aporte energético a las neuronas y en el metabolismo. La astrogliá también es responsable de la síntesis de compuestos antioxidantes y de factores tróficos que ejercen un efecto neuroprotector. En presencia de factores exógenos o en determinadas condiciones fisiopatológicas la astrogliá libera citocinas proinflamatorias, contribuyendo a la neuroinflamación (295).

Las células microgliales y su función en la respuesta neuroinflamatoria han sido ampliamente estudiadas. La microglía tiene origen mesenquimal, y migra durante el desarrollo hacia el parénquima cerebral. En presencia de elementos extraños se produce su activación, con efectos tanto beneficiosos (regulación del proceso neuroinflamatorio, reparación del daño y regeneración) como nocivos (citotoxicidad). Actualmente se considera que la microglía activa presenta dos fenotipos distintos, M1 y M2, aunque algunos autores proponen hasta cuatro estados de activación diferentes: M1, M2a (reparador y regenerador), M2b (inmunoregulador) y M2c (desactivador) (296). El fenotipo M1 se caracteriza por ser principalmente citotóxico y es responsable de la defensa inicial del tejido frente al elemento responsable del daño en el mismo. La microglía M1 produce diversas citocinas proinflamatorias como el TNF- α , la IL-1 β o la IL-6, así como especies reactivas del oxígeno y óxido nítrico. Tras esta fase inicial de activación tiene lugar la reparación del daño producido en el tejido y la regulación de la respuesta neuroinflamatoria. La microglía M2 es responsable de dicho proceso a través de la producción de citocinas antiinflamatorias como la IL-4 y la IL-10 (297). Además, la microglía M2 es capaz de inducir la producción de factores neurotróficos como el IGF-1, promoviendo la supervivencia neuronal, y de fagocitar los elementos extraños presentes en el tejido (298).

El sistema endocannabinoide se encuentra estrechamente implicado en la regulación de la neuroinflamación. La expresión de los receptores de cannabinoides CB₁ y CB₂ ha sido descrita tanto en astrogliá como en microglía (299) (300) (301). También ha sido demostrada la capacidad de la microglía de sintetizar e incluso metabolizar compuestos endocannabinoides como el 2-AG y la anandamida (302) (303). En el caso de los astrocitos, la actividad tanto del receptor CB₁ como la del receptor CB₂ reduce la liberación de citocinas proinflamatorias como el TNF- α y la producción de NO. Además,

la activación del receptor CB₁ promueve la liberación de citocinas antiinflamatorias como la IL-6 (304). Los compuestos cannabinoides también regulan la liberación de glutamato en las terminaciones nerviosas a través de los astrocitos. En cultivos de este tipo celular, el bloqueo de los receptores CB₁ reduce la recaptación de glutamato, de tal forma que el nivel de glutamato en el medio aumenta, lo que en última instancia reduce su liberación, inhibiendo la actividad sináptica y reduciendo la excitotoxicidad (305). El bloqueo del receptor CB₁ y la activación de CB₂R inhibe la liberación de D-aspartato, otro neurotransmisor excitador, cuya liberación está aumentada en condiciones neuroinflamatorias (306). En presencia de péptido Aβ tiene lugar la activación de la astrogliá. El bloqueo del receptor CB₁ y la activación del receptor CB₂ tiene como resultado una reducción negativa de la respuesta de la astrogliá a la presencia del péptido Aβ. Además, la expresión del receptor CB₁ y la síntesis de anandamida se reducen en presencia del péptido Aβ, mientras que por el contrario la expresión de CB₂R y la síntesis de 2-AG se incrementan (307).

En microglía, el sistema endocannabinoide regula estrechamente la respuesta inflamatoria. La activación de los receptores CB₁ y CB₂ con agonistas selectivos como WIN55,212-2 o JWH133 previene la activación de la microglía en presencia del péptido Aβ (181). Al igual que en la astrogliá, los compuestos cannabinoides reducen la liberación de citocinas proinflamatorias y la producción de NO en cultivos de microglía. Una parte importante de la función de la microglía es el movimiento a través del tejido en busca de elementos extraños que pueden ejercer un efecto neurotóxico. La presencia de dichos elementos favorece la quimiotaxis celular de la microglía. Este proceso también se encuentra regulado por la actividad de los receptores cannabinoides, de tal forma que la presencia de sustancias cannabinoides como el THC o ligandos endocannabinoides como el 2-AG favorecen la motilidad de la microglía. Los resultados de algunos estudios sugieren que este fenómeno se encuentra estrechamente ligado a la actividad del receptor CB₂, puesto que el uso de antagonistas selectivos de este receptor reducen en gran medida la motilidad de la microglía (308). El fenómeno de la migración de la microglía se considera neuroprotector, puesto que su función principal es que las células de la microglía viajen hasta el foco del daño y cumplan una función fagocítica. Por lo tanto, el tratamiento con agonistas cannabinoides podría resultar interesante desde el punto de vista de la motilidad celular. Sin embargo, existen estudios que afirman que el tratamiento con compuestos cannabinoides tiene justo el efecto contrario. La presencia de la proteína de origen vírico Tat en cultivos microgliales produce la activación de la microglía. El tratamiento con cannabinoides en estas circunstancias reduce la motilidad de la microglía, mientras que el bloqueo selectivo del receptor CB₂ ejerce el efecto contrario (309). A pesar de estas excepciones se considera que la actividad cannabinoide favorece mayoritariamente la motilidad microglial.

Otro fenómeno que tiene lugar en procesos neuroinflamatorios es la proliferación de la microglía. Sin embargo, la conclusión de diversos estudios llevados a cabo en cultivos microgliales es que este proceso no se encuentra regulado por el sistema endocannabinoide. La presencia de endocannabinoides en cultivos microgliales no promueve *per se* la proliferación de la microglía, si bien potencia la proliferación de aquellos cultivos microgliales que se encuentran en fase proliferativa o en presencia del factor de estimulación de colonias de macrófagos (MCSF).

En conjunto, el sistema endocannabinoide resulta una interesante diana terapéutica en el control de los procesos neuroinflamatorios, tanto por la regulación de la síntesis y liberación de sustancias citotóxicas y proinflamatorias, como por favorecer la liberación de citocinas antiinflamatorias y la motilidad de la microglía. Existe también mucho trabajo por hacer en el estudio de cómo influye el sistema endocannabinoide en el cambio de fenotipo de la microglía desde M1 a M2. El fenotipo M1 es regulado por el sistema endocannabinoide, pero también resulta importante constatar si la actividad de este sistema puede potenciar o favorecer el fenotipo M2 neuroprotector. También resulta prometedora la investigación en el área de la neuroinflamación sobre el receptor CB₂, cuya expresión se encuentra potenciada en diversos procesos patológicos y en neuroinflamación, y que carece de los efectos secundarios psicoactivos de CB₁R.

1.5. Sistema endocannabinoide y enfermedades neurodegenerativas

El sistema endocannabinoide, como ha sido descrito con anterioridad, se encuentra implicado en diversos procesos fisiológicos y fisiopatológicos del SNC. Las alteraciones de este complejo sistema pueden ser las desencadenantes de dichos procesos, o pueden estar implicadas en los mecanismos de reparación y control del daño producido por la enfermedad. Esto convierte a los componentes del sistema endocannabinoide en interesantes dianas terapéuticas asociadas a diferentes patologías. De hecho, ha sido estudiado en profundidad el rol del sistema endocannabinoide en los procesos neurodegenerativos, y concretamente en las enfermedades de *Alzheimer*, *Parkinson* y *Huntington* (310).

1.5.1. Enfermedad de *Alzheimer*

La enfermedad de *Alzheimer* (AD) es un proceso neurodegenerativo con un gran impacto social, siendo la forma más común de demencia que cursa con una pérdida progresiva de la memoria y la capacidad de generar recuerdos nuevos. Fue descrita por primera vez en el año 1906 por el neurólogo y psiquiatra alemán Aloysius Alois Alzheimer tras haber detectado un caso de esta enfermedad en el año 1901 (311). Esta patología puede tener un origen genético familiar, que representa un porcentaje de cerca del 5% de todos los casos. Sin embargo, en el 95% restante el origen es esporádico. Enfermedades como la diabetes y la expresión del alelo ApoE4 han sido descritos como posibles factores de riesgo de la AD. La AD es un proceso de degeneración tisular cerebral desarrollado principalmente en áreas como la corteza frontal y el hipocampo, ambas ricas en receptores CB₁ (312). La característica microscópica más representativa de esta patología es la presencia de placas de la proteína β-amiloide, así como estructuras en ovillo de la proteína Tau hiper-fosforilada. Estos agregados inducen la muerte neuronal, desencadenando procesos de neuroinflamación con una potente activación de la microglía. La proteína β-amiloide se sintetiza a partir de la proteína precursora amiloide (APP) por la acción de las proteínas β-Secretasa y γ-Secretasa. Esto da lugar a proteína β-amiloide de diferentes longitudes, desde los 30 hasta los 51 residuos. Las formas más frecuentes son la 40 y la 42, siendo esta última la que presenta una mayor tendencia a formar agregados (313). En condiciones fisiológicas, la proteína Tau está involucrada en el ensamblaje de microtúbulos y su estabilización. Se encuentra

predominantemente en la región axonal y presenta cerca de 85 sitios de fosforilación diferentes que regulan su actividad (314). La desregulación de la actividad de algunas Kinasas como GSK3 β ha sido relacionada con una mayor fosforilación de la proteína Tau, que favorece su agregación (315). Existen evidencias de que el sistema endocannabinoide juega un papel importante en la AD, por lo que constituye una importante diana terapéutica a distintos niveles en la elaboración de posibles tratamientos para la enfermedad (Figura 16).

Si nos centramos en los efectos del sistema endocannabinoide en la AD, cabe destacar que en modelos animales de esta enfermedad se ha observado una reducción significativa en los niveles de endocannabinoides en corteza frontal e hipocampo (316). Concretamente, en un modelo de AD en ratón con sobreexpresión de APP se produce una disminución en los niveles de anandamida en el hipocampo (317). Algunos estudios epidemiológicos realizados en tejidos *post-mortem* parecen indicar una menor expresión de receptores CB₁ comparado con individuos que presentan un envejecimiento normal, aunque en correlación únicamente con hipofagia y no con los marcadores característicos de la enfermedad o las alteraciones cognitivas. Sin embargo, parece que la expresión de CB₂R se ve aumentada en correlación con un importante marcador de la enfermedad, el péptido A β ₄₂, y en respuesta a la activación de la microglía (318). Algunos estudios han empleado agonistas cannabinoides en modelos de la enfermedad de AD y han observado mejoras en las alteraciones en memoria debidas a la acumulación del péptido A β , y en cultivos microgliales el tratamiento con agonistas previene la activación de la microglía inducida por el péptido A β (181). La fagocitosis inducida por este péptido es bloqueada mediante la activación del receptor CB₂ con agonistas específicos como el JWH015 (319). En astrocitos, los tratamientos con ligandos endógenos como la anandamida previenen la actividad de los hemicanales que constituyen las uniones tipo GAP, y parece que también se reduce el perfil inflamatorio observado en este tipo celular en presencia del péptido A β (320). La activación del receptor CB₁ en neuronas ejerce un efecto neuroprotector frente a la neurotoxicidad inducida por la neurotransmisión en pacientes con AD (321). CB₁R también juega un papel importante frente a la apoptosis inducida por el péptido A β en neuronas. En la AD el péptido A β afecta la permeabilidad de los lisosomas a través de la proteína supresora de tumores p53, promoviendo la apoptosis. La activación del receptor CB₁ estabiliza los lisosomas y evita el efecto pro-apoptótico del péptido A β (322).

Las enzimas de síntesis de ligandos endocannabinoides como la FAAH también parecen verse alteradas en la AD. Los pacientes de esta enfermedad presentan niveles reducidos de expresión de la FAAH, y también ha sido observada una hipometilación de su gen promotor en células circulantes mononucleares sanguíneas (323), así como una menor actividad de la FAAH en la corteza cerebral (324). Por otro lado, en animales pretratados con péptido A β se ha observado un incremento en la expresión de la DAGL en el hipocampo, con el consiguiente aumento de la síntesis del endocannabinoide 2-AG. En consecuencia, se produce una alteración de la neurotransmisión GABAérgica como resultado de una prolongación de la supresión de la inhibición inducida por despolarización, lo que puede desembocar en el silenciamiento de las sinapsis GABAérgicas del hipocampo, contribuyendo a la disrupción progresiva de la neurotransmisión en la AD (325). De forma interesante, la inhibición de la MAGL, responsable de la degradación del 2-AG, ha sido relacionada con una menor deposición

de A β . La inhibición de la MAGL reduce la expresión de la enzima responsable de la producción de A β , BACE1, y también reduce la neuroinflamación al regular la actividad de la microglía y los astrocitos. Además, promueve la supervivencia de las neuronas y ayuda a mantener la integridad y la estructura de las sinapsis. En modelos animales de la AD la inhibición de la MAGL favorece la plasticidad sináptica y la recuperación de la memoria espacial (326). Parece ser que el mecanismo por el cual la MAGL afecta a la síntesis de la BACE1 tiene que ver con el RNA de interferencia miRNA-188-3p. En pacientes con AD hay una menor expresión de este miRNA, responsable de la inhibición de la expresión del gen que codifica para la BACE1. La sobreexpresión de miRNA-188-3p protege frente a la neuroinflamación y previene contra la pérdida de memoria, las alteraciones en el aprendizaje espacial y el deterioro de la transmisión sináptica en el hipocampo. El tratamiento con 2-AG aumenta la expresión de miRNA-188-3p (327).

La acumulación del péptido A β produce un aumento de numb, la proteína inhibidora del receptor transmembrana notch-1. La actividad de la anandamida en neuronas favorece la señalización vía notch-1. Además, en presencia de anandamida o de 2-AG se produce una regulación negativa de la síntesis de numb, favoreciéndose así la señalización de notch-1 incluso en presencia del péptido. De esta forma, la anandamida podría estar favoreciendo vía notch-1 tanto la neurogénesis como la restauración de los déficits cognitivos de la AD (328). Por otro lado, el 2-AG ejerce un efecto protector frente al péptido A β , inhibiendo la expresión de la COX-2. Este efecto es mediado por la activación del receptor CB₁. La actividad del 2-AG también ha sido relacionada con una reducción de la neuroinflamación inducida por acumulación del péptido A β (329) (330).

En ratones K.O. para CB₂R se produce un aumento en la deposición del péptido A β , aunque la falta del receptor no acelera la pérdida de memoria ni incrementa la formación de ovillos de proteína Tau. En estos mismos animales la falta de CB₂R no reduce los efectos beneficiosos observados en el tratamiento con THC. Esto podría indicar que CB₂R no juega un papel relevante en posibles tratamientos con cannabinoides destinados a la mejora de los déficits cognitivos en la AD, aunque es evidente que sí está implicado en la formación de depósitos de A β y por lo tanto es una interesante diana terapéutica en este aspecto (331). El tratamiento con CBD reduce la expresión de genes relacionados con la fosforilación de Tau, como la quinasa GSK3 β , y también afecta a genes de secretasas implicadas en la generación del péptido A β . Al parecer el mecanismo está más relacionado con la actividad de TRPV₁ que con la actividad de CB₁R o CB₂R (332). La proteína de baja densidad relacionada con receptores de lipoproteínas 1 o LRP1 favorece la eliminación del péptido A β a través de la barrera hematoencefálica (333). La activación del receptor CB₁ aumenta la expresión de LRP1 y por lo tanto la eliminación de A β , siendo otro mecanismo más que explica cómo está relacionado el sistema endocannabinoide con la acumulación del péptido A β (334). La activación de CB₁R y CB₂R parece potenciar la actividad del receptor PPAR γ induciendo un efecto protector frente a la neuroinflamación y la neurodegeneración. También favorece la supervivencia celular en neuronas frente a la toxicidad inducida por el péptido A β . Además, los ligandos cannabinoides afectan a la morfología de las placas seniles, pero no parece que la morfología de las mismas guarde relación con los efectos neuroprotectores de los tratamientos con cannabinoides (335) (336).

La delección del receptor CB₂ en modelos de AD afecta a la respuesta inflamatoria. En dicha situación la microglía pierde capacidad de respuesta frente a estímulos

proinflamatorios y se produce una reducción en el número de células microgliales y de macrófagos infiltrados en el tejido. La concentración de citocinas y quimioquinas proinflamatorias se reduce en el cerebro, así como también se reducen los niveles de $A\beta_{40-42}$ solubles. La reducción de la neuroinflamación en estos animales no parece afectar a la memoria espacial ni al aprendizaje, por lo que CB_2R jugaría un papel importante en neuroinflamación, pero independiente de las alteraciones cognitivas debidas al péptido $A\beta$ (337). La activación de CB_2R con agonistas como el JWH015 reduce la acumulación de $A\beta$ sintético y nativo en ciertos modelos celulares, aunque ha mostrado ser ineficaz en otros (338). Por otro lado, el tratamiento con el agonista JWH133, selectivo del receptor CB_2 , mejora el rendimiento cognitivo en animales modelo de AD al reducirse la actividad de la microglía y la liberación de citocinas proinflamatorias. También incrementa la expresión de GSK3 β inactiva, afectando a la hiperfosforilación de Tau mediada por esta quinasa. La activación de CB_2R por JWH133 reduce la peroxidación de lípidos e incrementa la expresión de las superóxido dismutasas SOD1 y SOD2 en las regiones donde se acumulan las placas seniles (339). En conjunto, todos los hallazgos aquí mencionados obtenidos en diversos estudios muestran la íntima relación entre el sistema endocannabinoide y la AD, con implicación tanto de los enzimas relacionados con la síntesis y degradación de los endocannabinoides como de los receptores CB_1 y CB_2 . Por lo tanto, queda patente la relevancia de este sistema como diana terapéutica en el diseño de fármacos que, si bien individualmente parece ser que no servirán como cura para esta compleja enfermedad, si podrían ser de ayuda en la prevención de los síntomas de la enfermedad y el tratamiento paliativo de la misma.

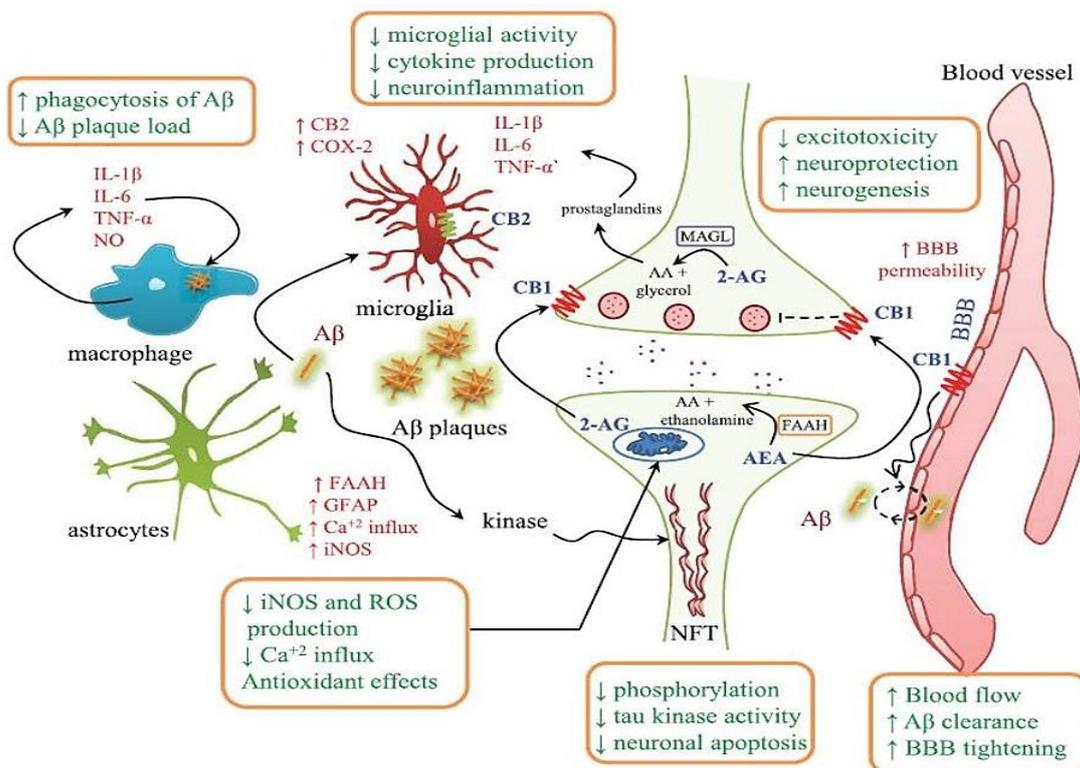


Figura 16. Efectos del tratamiento con cannabinoides en la enfermedad de Alzheimer. Extraído de G. Bedse et al., 2014 (340).

1.5.2. Enfermedad de *Parkinson*

La enfermedad de *Parkinson* (PD) es una enfermedad neurodegenerativa que afecta a las células dopaminérgicas de la sustancia *nigra*, destruyendo los circuitos dopaminérgicos de los ganglios basales y produciendo alteraciones en el control motor como bradicinesia, temblores, rigidez, trastornos en el equilibrio y anomalías posturales (341). Es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente y fue descrita por primera vez en el año 1817 por el científico británico James Parkinson, quién la denominó como “parálisis agitante”. Esta enfermedad afecta a ambos sexos por igual y normalmente los síntomas se presentan en adultos de edad avanzada. La prevalencia aumenta con la edad, aunque en un bajo porcentaje de casos, estos síntomas aparecen antes de los 50 años (342) (343). Se trata de una enfermedad principalmente esporádica, aunque también puede existir un origen genético familiar. Una de las principales características de esta enfermedad son los denominados cuerpos de Lewy, agregados de proteína α -sinucleína presentes en la sustancia *nigra* que causan citotoxicidad y favorecen la pérdida neuronal, afectando a las mitocondrias y a la integridad nuclear (344). La proteína α -sinucleína está codificada por el gen SNCA (locus PARK1) y ha sido relacionada con la plasticidad sináptica, el aprendizaje y la liberación de neurotransmisores en condiciones fisiológicas normales (345).

Para entender la enfermedad de Parkinson hay que comprender el funcionamiento de las vías directa e indirecta del movimiento en las que intervienen los ganglios basales. Estos son un conjunto de estructuras subcorticales interconectadas entre sí y con la corteza y que cumplen funciones motoras. Los ganglios basales están formados por el estriado, constituido por caudado y putamen, el globo pálido, constituido a su vez por el globo pálido interno y externo, el núcleo subtalámico y la sustancia *nigra*, compuesta de *sustancia nigra* reticulada y compacta. Los ganglios basales se encuentran dispuestos de tal manera que la información se transmite de forma ordenada, siguiendo su disposición anatómica. La corteza cerebral se proyecta sobre los núcleos de entrada (estriado: caudado y putamen), que procesan la información y la transmiten hacia los núcleos de salida (globo pálido interno y sustancia *nigra* reticular) a través de estructuras intermedias (globo pálido externo y núcleo subtalámico). Las fibras que llegan desde la corteza hacia el estriado son excitadoras, y su principal neurotransmisor es el glutamato. Desde el estriado se originan las vías directa e indirecta del control del movimiento, y las fibras que se proyectan desde esta estructura son inhibitoras (cuyo neurotransmisor es GABA).

Las eferencias del estriado en la vía directa se dirigen directamente hacia el globo pálido interno y la sustancia *nigra* reticulada. En la vía indirecta, las eferencias se dirigen hacia el globo pálido externo, que a su vez está conectado a través de fibras inhibitorias con el núcleo subtalámico. Este último transmite la información por medio de fibras excitadoras hacia los núcleos de salida. Finalmente, las proyecciones de los núcleos de salida, que son de tipo inhibitor, se dirigen hacia el tálamo motor, que se encuentra conectado a su vez con la corteza a través de fibras excitadoras. La vía directa es hipercinética, por lo que facilita el movimiento. La activación del estriado inhibe los núcleos de salida, de manera que el tálamo queda desinhibido y dirige señales excitadoras hacia la corteza. Por otro lado, la vía indirecta es hipocinética y posee el efecto contrario. La inhibición del globo pálido externo desde el estriado causa una mayor actividad del núcleo subtalámico, que a su vez activará a los núcleos de salida,

inhibiendo al tálamo y las señales hacia la corteza. En la realización de movimientos voluntarios ambas vías se encuentran en equilibrio, lo que se conoce como normocinesia. Ambas vías están reguladas por la dopamina liberada por la sustancia *nigra* compacta, que actúa sobre los receptores D₁ expresados principalmente en las neuronas de la vía directa, activándola, y sobre los receptores D₂, expresados en la vía indirecta, inhibiéndola (346). En la enfermedad de *Parkinson* se produce una pérdida de neuronas de la sustancia *nigra* compacta. Cuando la muerte neuronal afecta al 80% de las neuronas dopaminérgicas de esta región comienzan a producirse los síntomas clásicos de la enfermedad, debido a una desregulación de las vías directa e indirecta del movimiento. La muerte de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra* que inervan el estriado ha sido relacionada con múltiples factores, como la neuroinflamación, el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y la acumulación de la proteína α -sinucleína, que genera los cuerpos de Lewy y fomenta la neuroinflamación (347) (348).

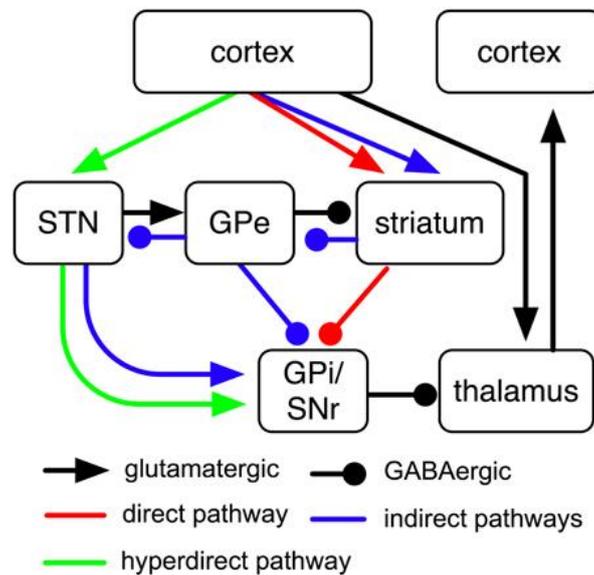


Figura 17. Vías directa e indirecta del control del movimiento. Extraído de Schroll et al., 2016 (346).

Se sabe que el sistema endocannabinoide se encuentra implicado en el control del movimiento modulando la neurotransmisión de GABA, glutamato y otros neurotransmisores en los ganglios basales (349) (350) (351), y ha sido estudiado en profundidad en relación a la enfermedad de *Parkinson* como potencial diana terapéutica por su relación con la neuroinflamación y el control de la señalización. El aumento en la actividad del sistema endocannabinoide al tratar con THC causa una disminución en la recaptación de GABA en el globo pálido que ha sido relacionado por algunos autores con sintomatología parkinsoniana (352). Existen evidencias de que tanto el sistema endocannabinoide como su señalización guardan relación con los procesos de la PD. Por ejemplo, en modelos de PD y de discinesia inducida por levodopa (LID) en primate se ha observado que el antagonista del receptor CB₁, rimonabant, mejora la sintomatología de los animales, así como también se observa un incremento en la concentración de endocannabinoides en correlación con la sintomatología (353). Otros autores señalan que el tratamiento con THC mejora la discinesia en la LID (354). En animales modelo de PD se ha encontrado una concentración de endocannabinoides 7 veces superior a la normal en el globo pálido, que es reducida al tratar con agonistas del receptor D₂ y D₁ y

con el antagonista del receptor CB₁ rimonabant. El tratamiento con quinpirole y rimonabant recupera parte de los síntomas motores encontrados en el modelo de la enfermedad (355). En pacientes de la PD la concentración de 2-AG está aumentada en líquido cefalorraquídeo, lo que por otra parte ha sido recientemente señalado como un factor protector frente a los síntomas de esta enfermedad. La inducción de los síntomas clásicos con MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), sustancia sintética y neurotóxica que provoca la muerte de neuronas dopaminérgicas del estriado, da como resultado un aumento en la concentración de 2-AG, que unido a la inhibición de la MAGL y la COX-2 reduce la neuroinflamación regulando la respuesta inmune (356) (357). Recientemente se ha descrito que la inhibición de la FAAH, con el objetivo de aumentar la concentración de anandamida, ejerce un efecto neuroprotector sobre la muerte de neuronas dopaminérgicas tras su inducción mediante MPTP (358). La activación de CB₁R en ratones tratados con MPTP reduce la neurotoxicidad del compuesto y favorece la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales, mientras que el bloqueo de CB₁R revierte el efecto beneficioso del tratamiento con cannabinoides. Este efecto se observa *in vitro* únicamente en cultivos celulares de neuronas en presencia de microglía, lo que indica que el efecto del tratamiento está mediado por el control en la inflamación por parte de CB₁R en la microglía (359).

La expresión del receptor CB₁ parece aumentada en la enfermedad de Parkinson en modelos animales en los que también se ha demostrado una mayor actividad de los receptores y un incremento de la activación de proteína G en los ganglios basales (360). El antagonismo de CB₁R da como resultado una mejora de la hipocinesia, sin mejora de la neurotransmisión dopaminérgica o cambios en la glutamatérgica y GABAérgica en caudado y putamen (361). Además del tratamiento con MPTP, también existen otros modelos de PD inducidos por sustancias neurotóxicas como la 6-Hidroxidopamina (6-OHDA). Este compuesto análogo de la dopamina puede ser capturado por el transportador de dopamina, por lo que presenta especificidad por neuronas dopaminérgicas como las de la sustancia *nigra*. El mecanismo por el cual la 6-OHDA ejerce sus efectos no está claro del todo, pero se han propuesto tres mecanismos diferentes: i) Auto-oxidación de la 6-OHDA que da lugar a la formación de especies reactivas del Oxígeno, ii) formación de peróxido de hidrógeno por acción de la monoaminoxidasa o iii) inhibición del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (362). La inyección de 6-hidroxidopamina en ratones causa alteraciones emocionales y cognitivas que mejoran al tratar a los animales con rimonabant (363). Algunos autores que han llevado a cabo estudios similares en ratas con lesiones unilaterales provocadas con 6-hidroxidopamina, han observado un efecto neuroprotector mediado por la microglía al antagonizar el receptor CB₁ y el receptor A₂A (364). En ratones tratados con 6-hidroxidopamina, los niveles de anandamida están aumentados mientras que la actividad de la FAAH y del transportador de membrana de la anandamida tienen una actividad reducida en el estriado. Sin embargo, la frecuencia y la amplitud de las corrientes postsinápticas espontáneas mediadas por glutamato están aumentadas en las neuronas espinosas del estriado, por lo que el aumento de la concentración de anandamida en respuesta al daño tóxico sirve para restaurar el estado fisiológico normal. El tratamiento de estos animales con levodopa revierte estos efectos inducidos por la 6-hidroxidopamina, aunque la levodopa puede inducir discinesia. La inhibición de la FAAH recupera la neurotransmisión por glutamato normal (365). En modelos similares de PD inducida por 6-hidroxidopamina, el tratamiento con THC y CBD afecta a la

reducción de los niveles de dopamina en el estriado. Dicho efecto perdura incluso después de retirar el tratamiento. Esto, sumado al hecho de que el CBD parece no interactuar directamente con los receptores de cannabinoides, podría indicar que ambos compuestos ejercen su efecto bien a través de sus propiedades antioxidantes o modulando la respuesta inflamatoria (366).

En modelos transgénicos en los que se han eliminado genes esenciales en el desarrollo de PD como PARK1 (que codifica para α -sinucleína), PARK 2 (que codifica para la ligasa parquin) o PARK 6 (que codifica para la quinasa PINK1) se produce un cambio bifásico en el receptor CB₁. Primero se observa una reducción de los niveles de mRNA de CB₁R en caudado y putamen, con una reducción en el *binding* del receptor en el globo pálido. En edades más avanzadas de estos animales transgénicos se observa, por el contrario, un incremento en los niveles de mRNA del receptor en esas mismas áreas. En resumen, en las fases iniciales de la enfermedad tiene lugar una disminución en la expresión del receptor CB₁ cuando se está produciendo una disfunción en la señalización dopaminérgica, seguido de un aumento en la expresión del receptor CB₁ en fases más avanzadas, cuando comienza a producirse la muerte neuronal (367).

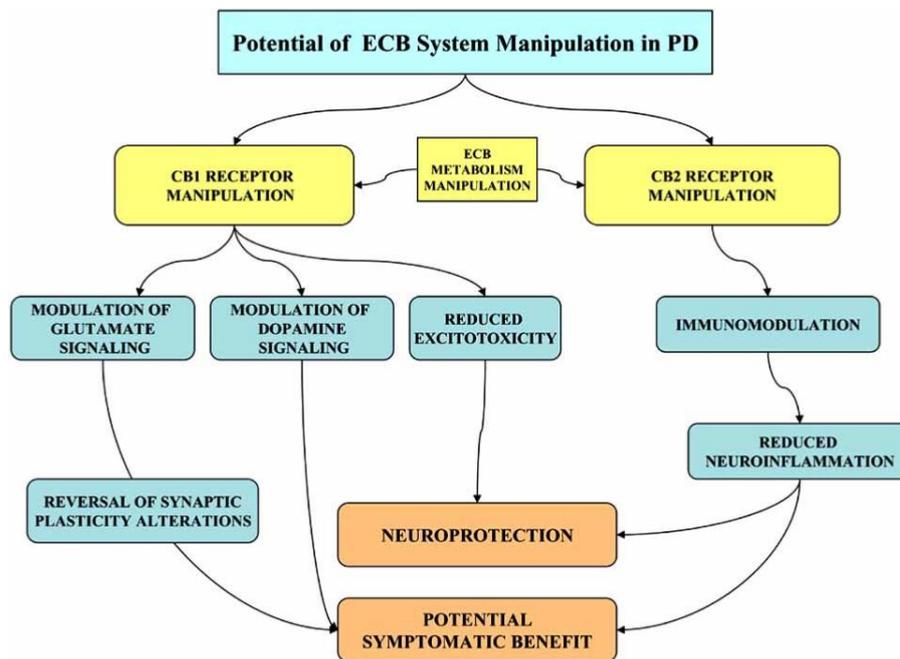


Figura 18. Potencial del tratamiento con endocannabinoides en la enfermedad de *Parkinson*. Extraído de Massimiliano Di Filippo et al., 2008 (368).

El receptor CB₂ ha sido implicado en la regulación de la neuroinflamación en la microglía activa en enfermedades neurodegenerativas. En ratones modelo de PD tratados con MPTP se observa un aumento en la expresión de CB₂R en la región ventral del mesencéfalo. El tratamiento con JWH015, agonista selectivo de CB₂R, o con WIN55,212-2 en presencia del antagonista de CB₁R reduce la activación de la microglía inducida por el MPTP, lo cual demuestra que el proceso está mediado por el receptor CB₁ y no CB₂. Por otro lado, la eliminación del receptor CB₂ provoca un aumento en la toxicidad del MPTP (369). De forma similar, el tratamiento con LPS provoca un proceso inflamatorio similar al observado en la PD con una elevación en la expresión de citocinas proinflamatorias, activación de la microglía e infiltración de células de la periferia. Los ratones K.O. para el receptor CB₂ muestran una mayor muerte de neuronas que

expresan la tirosina hidroxilasa en la sustancia *nigra* en comparación con ratones *wild-type*. Además, la ausencia del receptor CB₂ incrementa la activación de la microglía y la infiltración de macrófagos de la periferia, sobre todo en sustancia *nigra*. El tratamiento con LPS provoca también un aumento en los niveles de mRNA de CB₂R en estriado y sustancia *nigra* de animales *wild-type*. Además, la activación del receptor CB₂ reduce la expresión de citocinas proinflamatorias y reduce la activación de la microglía (370). Estos resultados evidencian la importancia del receptor CB₂ en la patofisiología de la PD y cómo este receptor puede ser una interesante diana terapéutica en el control de la neuroinflamación. En conjunto, el sistema endocannabinoide tiene potencial como diana en el tratamiento de la enfermedad de *Parkinson*.

1.5.3. Enfermedad de *Huntington*

La enfermedad de *Huntington* (HD) es un proceso neurodegenerativo hereditario, descrito por primera vez en el año 1871 por el médico estadounidense George Huntington. La enfermedad está causada por un aumento en el número de tripletes CAG de la secuencia del gen que codifica para la proteína Huntingtina (HTT). Normalmente la HTT contiene entre 6 y 35 repeticiones del triplete CAG, que codifica para el aminoácido glutamina (Q). En individuos con la HD el número de repeticiones supera las 36, de tal forma que se genera una secuencia poliQ en el dominio amino terminal de la proteína HTT (371). En la célula existen enzimas que reconocen estas secuencias anormalmente largas y las cortan, dando lugar a inclusiones neuronales intranucleares. Estas inclusiones fueron consideradas en un principio como la causa principal de la HD y responsables de la muerte neuronal característica de la enfermedad (372). Sin embargo, estudios recientes indican que estas inclusiones también pueden favorecer la supervivencia neuronal al agregar la proteína HTT mutada y disminuir su solubilidad (373) (374). Por otro lado, la disfunción mitocondrial ha sido también relacionada con la fisiopatología de la enfermedad. La mutación de la HTT afecta a diversos factores de la transcripción como CREB y PPAR γ , causando en último lugar una disminución en la expresión de genes mitocondriales (375). El estrés oxidativo y la activación de la microglía también son considerados factores que favorecen el progreso de la enfermedad (376) (377). Los síntomas de la HD van desde alteraciones motoras progresivas denominadas coreas hasta alteraciones cognitivas. Durante el avance de la enfermedad se va produciendo una pérdida progresiva de neuronas en regiones de los ganglios basales como el estriado, la sustancia *nigra* y el globo pálido, y también se produce pérdida neuronal en la corteza cerebral.

Como ya ha sido mencionado, el sistema endocannabinoide juega un importante papel en el control de la señalización en los ganglios basales donde se encuentra relacionado con el control motor. Algunos autores han reportado una disminución en la expresión del receptor CB₁ en modelos de HD en caudado, putamen, globo pálido y sustancia *nigra* (378). Más concretamente, en ratones transgénicos RS/2, modelo de HD, se observa una disminución en los niveles de mRNA de CB₁R en estriado en las fases iniciales de la enfermedad, y una menor expresión de CB₁R en sustancia *nigra*. También se ha observado una reducción importante del *binding* de ligandos específicos al receptor. Por otro lado, los ligandos endógenos anandamida y 2-AG muestran unos niveles alterados en este modelo: Mientras que el 2-AG aumenta en la corteza, existe

una reducción en la concentración de anandamida en el hipocampo (379). Sin embargo, otros autores reportan que en corteza cerebral y estriado se produce una disminución en los niveles de 2-AG en fases presintomáticas, mientras que en fases sintomáticas existe un aumento en la concentración de anandamida en la corteza, y una reducción en otras regiones como el estriado (380). Estas alteraciones en el sistema endocannabinoide en las fases tempranas de la enfermedad podrían ser consideradas como un marcador del inicio de la enfermedad (381). Por otro lado, en la HD también se producen alteraciones en las enzimas involucradas en el metabolismo de los ligandos endocannabinoides. La NAPE-PLD, enzima responsable de la síntesis de anandamida, presenta una actividad reducida en estriado de ratones R6/2 en fases avanzadas de la enfermedad, al igual que la DAGL, responsable de la síntesis de 2-AG (382). La actividad de los enzimas de degradación de endocannabinoides también se encuentra alterada: La FAAH, responsable de la degradación de la anandamida, presenta una actividad reducida en linfocitos de la periferia de pacientes de la HD que no parece estar relacionada con una disminución en la expresión de la enzima, sino con un bloqueo funcional de su actividad (383).

La expresión reducida del receptor CB₁ en la HD ha sido relacionada con la muerte de neuronas espinosas medianas GABAérgicas, en las que existe una elevada expresión del receptor CB₁. En fases presintomáticas de la HD se producen alteraciones en la regulación de las sinapsis GABAérgicas por parte del sistema endocannabinoide, que da lugar a una hiperactividad de estas (384) (385). En el globo pálido se produce una reducción en la expresión del receptor CB₁ acompañada de una sobreexpresión de GABA_A y GABA_B, que compensa la reducción en la actividad de GABA en el globo pálido en la HD (386). Estos cambios en los niveles de expresión del receptor CB₁ contribuyen al progreso de la HD. De hecho, en ratones K.O. para el receptor CB₁ tratados con ácido 3-Nitropropiónico (3NP) se produce una exacerbación de los síntomas de la enfermedad, con alteraciones motoras más graves y un efecto tóxico mayor del 3NP en comparación con ratones *wild-type* (387).

Mientras que la expresión de CB₁R está reducida tanto en fases tempranas como tardías de la enfermedad, el receptor CB₂ se encuentra sobreexpresado en células de la microglía en las fases tardías, y ha sido propuesto como diana terapéutica de la HD gracias a la falta de efecto psicoactivo de sus ligandos selectivos (388) (389). La activación del receptor CB₂ muestra un efecto neuroprotector de las neuronas de proyección estriatal en ratones modelo de HD inducida por malonato. El bloqueo del receptor CB₂ o la ausencia de éste potencia el efecto del malonato y por lo tanto la muerte neuronal. En este modelo se produce además una sobreexpresión de CB₂R en células de la microglía (184). Este fenómeno también ha sido descrito en pacientes de HD y en ratones R6/2. En estos animales el silenciamiento del receptor CB₂ produce un incremento en la activación de la microglía, agrava la sintomatología de la HD y reduce la vida de los ratones. En ratones *wild-type* en los que se ha inducido excitotoxicidad estriatal se ha observado que el tratamiento con agonistas de CB₂R reduce la pérdida neuronal, la inflamación y los síntomas motores (390).

Debido a que los hechos demuestran la importancia del sistema endocannabinoide en la HD, existen diversos estudios orientados a la determinación de la eficacia de los tratamientos con compuestos cannabinoides. El tratamiento con THC ejerce un efecto negativo, incrementando la toxicidad del malonato. Sin embargo, el tratamiento con

CBD revierte los efectos del THC. Además, el tratamiento con 2-AG y anandamida ejerce un efecto neuroprotector. Estos efectos se podrían explicar mediante el fenómeno del *biased agonism*, de tal forma que agonistas que promueven el reclutamiento de arrestinas ejercen un efecto negativo sobre la enfermedad, mientras que los que promueven la actividad de la proteína $G\alpha_i$ poseen un efecto beneficioso (391). La actividad del CBD no parece estar mediada por el receptor CB_1 , puesto que el tratamiento con antagonistas como el rimonabant no revierten el efecto del CBD en la HD, por lo que estaría actuando como modulador alostérico. Algunos tratamientos han mostrado la eficacia del sistema endocannabinoide en el control de la excitotoxicidad al regular los procesos de excitabilidad neuronal (392).

1.6. Sistema endocannabinoide y consumo de alcohol

1.6.1. Breve historia del consumo de bebidas alcohólicas

El ser humano lleva consumiendo bebidas alcohólicas desde tiempos inmemoriales. Se cree que en el paleolítico (hace unos 12000 años) el ser humano descubrió de forma accidental las primeras bebidas alcohólicas fermentadas. Se especula que el grano y la fruta recogida, mezclados con el agua de la lluvia y las levaduras naturales presentes en los alimentos, daban lugar a sustancias fermentadas que podrían ser consideradas como las primeras bebidas alcohólicas. La evidencia más antigua del consumo de bebidas alcohólicas procede de la antigua China, donde se han encontrado jarras de arcilla de hace 7000 años con restos de una antigua receta de una bebida fermentada elaborada con una mezcla de arroz, miel y fruta (393). El consumo de bebidas alcohólicas en la antigüedad estaba asociado tanto a ritos como a la medicina y el uso recreativo, por lo que se encontraba muy extendido. Este hecho dio lugar a la creación de distintas recetas entre las que se encontraba el vino, que supuestamente fue inventado en Armenia hace unos 6000 años. De la misma forma nació la cerveza, cuyo consumo se extendió rápidamente por todo el mundo antiguo. De hecho, las recetas de cerveza de los antiguos egipcios, que se cuentan por más de 20, no eliminaban los restos de trigo del mosto, dando lugar a un producto espeso considerado un alimento y no tanto una bebida, y que era consumido incluso por los niños. Además, las bebidas alcohólicas presentaban un beneficio importante en la antigüedad, y es que, ante la falta de recursos para potabilizar el agua, el consumo de bebidas con cierto grado alcohólico era una ventaja frente al riesgo de contraer enfermedades como el cólera por el agua contaminada.

El consumo de bebidas alcohólicas en rituales religiosos ya estaba muy extendido entre las religiones antiguas. En algunos casos como medio para alcanzar estados de trance. Bebidas como el vino han dejado una huella indeleble en culturas mediterráneas y de oriente próximo. Un claro ejemplo es la veneración al dios del vino (Dionysus en Grecia, Bakkhos en Roma) de la cultura greco-romana, donde en los rituales en honor a dicha divinidad se consumían grandes cantidades de alcohol. Entre otros ejemplos, encontramos el pueblo egipcio, que ofrecía vino y cerveza a sus dioses, a la vez que los consumían. Las culturas nórdicas bebían cerveza en honor a la caza o al Dios Odín, padre de todos los dioses de la mitología nórdica. En las culturas Judeocristianas el consumo de alcohol también juega un papel fundamental. En la eucaristía cristiana se consume vino simulando la sangre de Cristo tal y como se hacía en sus inicios y está recogido en

el nuevo testamento de la Biblia, mientras que, en la religión judía, tan famosa como la borrachera de Noé en el antiguo testamento es el consumo de vino en rituales y ofrendas a Yahveh. Por otro lado, en culturas como la china el consumo de bebidas alcohólicas estaba contemplado como remedio medicinal. De hecho, era considerado un tratamiento eficaz en el mundo antiguo contra la fatiga y la depresión. Asimismo, el consumo de alcohol también ha sido reconocido a lo largo de la historia como un método anestésico (394).

El desarrollo de técnicas de destilación durante la Edad media permitió innovar en la creación de nuevas bebidas alcohólicas, los destilados, con un mayor grado de alcohol. Estas bebidas alcanzaron un éxito similar al de las bebidas fermentadas. Sin embargo, a pesar de ser una costumbre aceptada en las culturas antiguas, también eran conocidos los efectos adversos del consumo de alcohol, que, desde entonces hasta la actualidad, han supuesto un importante riesgo para la salud humana siendo causa de una de las peores adicciones, la alcohólica, que a su vez es causante de múltiples patologías entre quienes la padecen. En algunos casos, como en la antigua China, la expansión de problemas con el alcohol entre la población llegó hasta tal punto que tuvo que prohibirse la producción y consumo de vino y cerveza. Durante la revolución industrial, en países como el Reino Unido, comenzaron a repudiarse aquellas actitudes impropias causadas por el consumo de alcohol y se puso en valor la sobriedad como requisito en la eficiencia laboral. Hoy en día, los problemas causados por el alcohol son los mismos que antes, pero por desgracia su consumo no tiene las mismas connotaciones negativas que el de otras drogas como el cannabis.

1.6.2. Consumo de alcohol: Metabolismo, neuroadaptaciones y sistema endocannabinoide

El alcohol es una droga socialmente aceptada entre la población. Su consumo, salvo en la cultura islámica, está muy extendido alrededor del mundo. Existen cientos de bebidas alcohólicas distintas, tanto fermentadas como destiladas, que son vendidas legalmente en establecimientos de hostelería y supermercados de prácticamente todo el planeta. Aunque en muchos países su venta está regulada y prohibida a menores de 18 años, el acceso de la gente joven a las bebidas alcohólicas no es difícil, y la edad de inicio en el consumo de esta droga es cada vez menor. El resultado es que progresivamente más gente joven tiene problemas derivados del consumo de alcohol, que además suele ir asociado al uso de otras drogas recreativas. En Estados Unidos se estima que 18 millones de personas sufren algún tipo de desorden relacionado con el consumo de alcohol (datos del *National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, NIAAA*). Si se tiene en cuenta la población mundial, esta cifra alcanza el 5%. Esto significa que unos 350 millones de personas pueden desarrollar adicción a esta droga, que suponen un importante problema sanitario en más de medio mundo, causando desde enfermedades hepáticas a problemas cardiovasculares y por supuesto, problemas de adicción.

Cuando una persona ingiere una bebida alcohólica, el etanol de esta es absorbido por difusión simple a través del epitelio del estómago y el intestino delgado. Rápidamente llega al torrente sanguíneo y es transportado desde el tracto gastrointestinal hacia el hígado, el principal órgano responsable de su metabolización. El etanol difunde

fácilmente a través de las membranas celulares, por lo que normalmente la concentración de etanol en órganos y tejidos es similar a la concentración en sangre. Esto significa que también puede atravesar con facilidad la barrera hematoencefálica y llegar hasta el cerebro. En la difusión y distribución del etanol por el organismo juega un papel importante la abundancia relativa de agua de cada tejido, por lo que en tejido adiposo la concentración de etanol tras la ingesta es muy baja. Gran parte del etanol ingerido es metabolizado por el hígado, aunque también puede ser procesado por el estómago. Las enzimas responsables de la metabolización del etanol son la enzima alcohol deshidrogenasa y la catalasa, aunque también interviene el sistema microsomal de oxidación del etanol. La enzima alcohol deshidrogenasa cataliza una reacción en la que a partir de etanol y nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) se produce acetaldehído y NAD reducido (NADH). El NADH puede ser empleado por las mitocondrias en la síntesis de ATP. Por otro lado, la catalasa cataliza una reacción en la que a partir de etanol y peróxido de hidrógeno se produce acetaldehído y agua. En último lugar, en el sistema microsomal de oxidación del etanol interviene el citocromo P450, que cataliza una reacción enzimática en la que, a partir de etanol, poder reductor en forma de NADH y Oxígeno se obtiene acetaldehído, NAD^+ y agua. El acetaldehído obtenido en estas reacciones es metabolizado por la enzima acetaldehído deshidrogenasa, que cataliza una reacción en la que a partir de acetaldehído y NAD^+ se obtiene acetato y NADH. El acetato obtenido puede dar lugar a acetil coenzima A que es empleado principalmente en la síntesis de ácidos grasos. Aunque cerca del 90% del etanol es oxidado por el metabolismo del cuerpo, el 10% restante es eliminado por la orina, el sudor y la respiración (395) (396) (397).

Los efectos más evidentes del consumo agudo de bebidas alcohólicas son aquellos provocados por las alteraciones en el SNC. El etanol, como ya ha sido mencionado, atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica, y por lo tanto es capaz de afectar directamente a las estructuras del cerebro. En primer lugar, el etanol altera las membranas celulares, y por lo tanto interfiere con los componentes de la membrana plasmática de las neuronas. Antiguamente se consideraba que, puesto que el etanol es un solvente orgánico, este afectaba a la fluidez de las membranas plasmáticas de las neuronas y por lo tanto los efectos observados se debían a este fenómeno. El efecto que ejerce el etanol en las proteínas celulares no es homogéneo, ya que hay algunos elementos como la AC (398) o factores de la transcripción como CREB que son más sensibles a los efectos de esta sustancia (399). El etanol también puede afectar a proteínas quinasas como la PKC, interactuando directamente con ella, potenciando su actividad y ejerciendo efectos anestésicos (400). Además, el etanol puede actuar directamente sobre los receptores ionotrópicos de GABA y de NMDA (Figura 19).

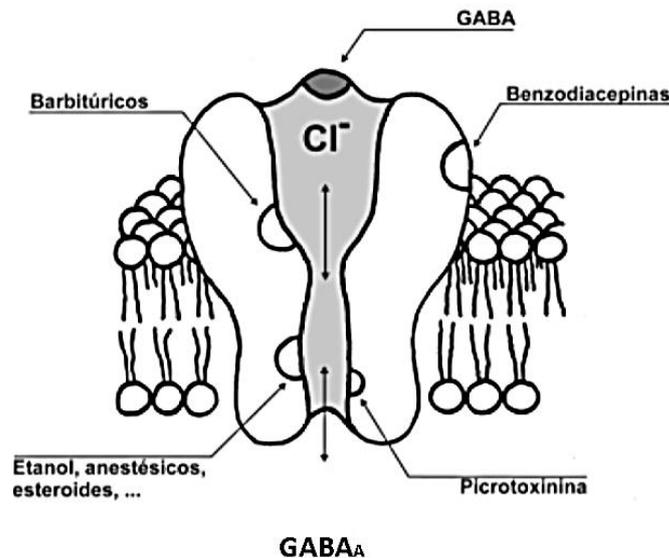


Figura 19. Lugar de interacción del etanol en el receptor GABA_A. Extraído de Ayesta FJ, 2002 (401).

De la interacción con estos dos receptores derivan la mayoría de efectos del etanol en el SNC (402). El etanol es capaz de potenciar la actividad de los receptores ionotrópicos GABA_A (403) (404). El complejo formado por el receptor GABA_A en la membrana neuronal forma un canal con cinco subunidades que permite el paso de iones como el Cl⁻, que disminuyen la excitabilidad neuronal. Existen diversos fármacos que pueden interactuar con este receptor, tal y como se observa en la figura 19. El etanol afecta la función del complejo porque es capaz de interactuar directamente sobre la proteína como regulador alostérico. El etanol no afecta de igual forma a todos los complejos GABA_A. Esto podría deberse a que existen múltiples subunidades diferentes que forman la estructura pentamérica de los receptores GABA_A en distintas combinaciones, cada una respondiendo de forma distinta al etanol (405). Existen discrepancias sobre cómo afecta el etanol a la actividad de GABA_A, aunque podría ser a través de una potenciación de los compuestos que lo activan. Por ejemplo, el etanol potencia la actividad de GABA_A favoreciendo la fosforilación de aquellos complejos formados por al menos una subunidad $\gamma 2$ a través de la PKC (406). La acción del etanol sobre GABA_A está implicada también en el refuerzo positivo en el consumo de bebidas alcohólicas. De hecho, el tratamiento con antagonistas de GABA_A en amígdala de ratas disminuye la ingesta de etanol en procesos experimentales (407). El consumo crónico de bebidas alcohólicas produce un incremento en la expresión de la subunidad $\alpha 2$ del receptor GABA_A en el núcleo accumbens, que ha sido relacionada también con un incremento en el riesgo de aparición de adicciones, como por ejemplo la alcohólica o la adicción a benzodiacepinas (408). Sin embargo, aunque la actividad de GABA_A es potenciada por acción del etanol, la síntesis de péptidos opioides también está potenciada, ejerciendo un efecto inhibitor de la neurotransmisión GABAérgica en el núcleo accumbens y potenciando la liberación de Dopamina, generándose así un efecto reforzador del consumo de bebidas alcohólicas (409).

El etanol también puede modular la actividad de los receptores NMDA, básicamente inhibiéndolos. El receptor NMDA participa en el fenómeno de potenciación a largo plazo (LTP) en las sinapsis. Este receptor puede ser activado por glutamato, un importante neurotransmisor excitador. El receptor NMDA es un canal que permite el flujo de iones

Na^+ , K^+ y Ca^{2+} al interior de la célula. Así, el etanol es capaz de inhibir el flujo de iones Ca^{2+} del exterior al interior de la célula inducido por la activación del receptor NMDA (410), de tal forma que la actividad del etanol sobre el receptor inhibe la LTP (411). La regulación negativa de la actividad del receptor NMDA parece estar implicada también en el fenómeno del *Blackout* en el hipocampo, es decir, en las pérdidas de memoria que se producen tras el consumo agudo de grandes cantidades de etanol (412). Además, la exposición al etanol incrementa la expresión del receptor NMDA. En períodos de abstinencia, se produce una hiperactividad debido al incremento en los niveles de expresión del receptor NMDA (413) que favorece la muerte neuronal por excitotoxicidad en regiones como el hipocampo. El exceso de actividad glutamatérgica además puede llegar a producir el conocido como *delirium tremens*, que lleva a la muerte si no es tratado adecuadamente (414). Estos procesos potencian también los efectos aversivos de la abstinencia alcohólica.

También se ha descrito la capacidad del etanol para afectar la liberación de dopamina en el circuito de la recompensa, aunque no se conoce con exactitud el mecanismo por el que el etanol ejerce este efecto. Este dato se encuentra estrechamente relacionado con alteraciones en la señalización dopaminérgica debido al consumo crónico de bebidas alcohólicas. Así, en animales tratados con etanol, la cronificación da como resultado una disminución en la liberación de dopamina en el núcleo accumbens y una disminución en la actividad dopaminérgica (415). También se ha observado cómo tras el consumo de etanol, se produce una liberación puntual de dopamina en el núcleo accumbens que poco a poco recupera los niveles basales de este neurotransmisor. Sin embargo, la disminución continúa y no se recuperan los niveles basales de dopamina hasta que vuelve a ingerirse etanol de nuevo. Este efecto puede contribuir al refuerzo negativo en períodos de abstinencia (416). Este tipo de neuroadaptaciones parecen jugar un papel importante en el desarrollo de la tolerancia al etanol y la abstinencia alcohólica.

Además de los cambios producidos por el etanol en los receptores NMDA y GABA_A , el sistema endocannabinoide está íntimamente relacionado con los efectos ejercidos por el etanol. De hecho, la adicción alcohólica está relacionada con la actividad del receptor CB_1 . De manera muy característica se ha descrito que los niveles de expresión del receptor CB_1 están reducidos en animales que han sido sometidos a la ingesta de etanol en la dieta. La expresión del receptor CB_1 en ratones K.O. para el receptor D_2 está aumentada en corteza cerebral, caudado y núcleo accumbens. La exposición a etanol revierte esta sobreexpresión. Esto indica que tanto el consumo de bebidas alcohólicas como la presencia del receptor D_2 regulan la expresión del receptor CB_1 (417). En animales *wild-type* que siguen un patrón crónico de consumo de etanol, los niveles de anandamida y 2-AG están aumentados. Estos animales presentan un consumo voluntario de etanol reducido. El mismo efecto se observa al antagonizar el receptor CB_1 . Por el contrario, los agonistas de CB_1R potencian la búsqueda e ingesta de etanol (418). La activación de CB_1R produce una inhibición de la neurotransmisión por GABA en zonas concretas del sistema de la recompensa como el área tegmental ventral, de tal forma que se elimina la inhibición ejercida por las neuronas GABAérgicas sobre las dopaminérgicas, favoreciendo la liberación de Dopamina. Así, se potencian los efectos reforzadores del consumo de bebidas alcohólicas, convirtiendo al receptor CB_1 en una interesante diana terapéutica en el tratamiento del alcoholismo (419) (420).

En animales en los que se ha simulado el patrón de ingesta de etanol en adolescentes, es decir, un patrón intermitente de consumo relacionado con actividades recreativas, los niveles de expresión del receptor CB₁ en el bazo se encuentran reducidos, mientras que los del receptor CB₂ muestran un claro incremento, afectando a la producción de citocinas proinflamatorias. Por otro lado, parece que el etanol no afecta de la misma manera a ambos sexos. Se ha descrito una diferencia clara entre sexos en la expresión de la NAPE-PLD, que está aumentada en hembras y reducida en machos. El significado funcional de este dimorfismo sexual no ha sido determinado todavía (421). Estas diferencias entre sexos de los efectos que ejerce el etanol en el sistema endocannabinoide también han sido observadas en el núcleo accumbens. En ratas macho se produce una reducción en el mRNA de la NAPDE-PLD, la DAGL y la MAGL tras el consumo intermitente de etanol, mientras que en las hembras los niveles de mRNA se mantienen constantes (422). Las diferencias en la cantidad de tejido adiposo también influyen en el efecto del etanol. Las hembras presentan una cantidad mayor de este tejido en comparación con los machos, por lo que el contenido en agua del cuerpo de las hembras es menor, lo que afecta directamente a la concentración de etanol presente en los tejidos donde puede diluirse.

Mediante la técnica de la tomografía por emisión de positrones ha podido comprobarse que en individuos que presentan dependencia alcohólica está reducida la unión del receptor CB₁ a sus agonistas. Esta situación se mantiene incluso hasta 4 semanas después de la abstinencia alcohólica. Parece ser que en individuos alcohólicos portadores del polimorfismo T/C rs2023239 del receptor CB₁, presente en el extremo 3' del segundo intrón del gen, la unión de ligandos cannabinoides no está tan reducida como en los individuos portadores del resto de polimorfismos (423). En el caso del receptor CB₂ también existe un polimorfismo **Q63R** que genera una mayor preferencia por el consumo de bebidas alcohólicas. Existen polimorfismos de la FAAH que afectan a los niveles de anandamida circulantes y que parecen favorecer el consumo de bebidas alcohólicas. Por ejemplo, en individuos con el polimorfismo **C385A** de la FAAH existe una mayor sensibilidad a la recompensa que está relacionado con una mayor facilidad para desarrollar desórdenes alcohólicos (424).

Los niveles de fitocannabinoides circulantes como el THC son mayores también en individuos que consumen conjuntamente cannabis y bebidas alcohólicas, en comparación con individuos que consumen únicamente cannabis. Esto significa que el etanol afecta a la absorción de THC, lo que potencia los efectos de la marihuana (425). Algunos autores han sugerido que el consumo conjunto de ambas sustancias, a pesar de que el etanol potencia el efecto del cannabis, podría ejercer un papel neuroprotector (426). Otros estudios llevados a cabo en células dendríticas derivadas de monocitos tratadas con etanol muestran cambios en los niveles de expresión de CB₁R, que confirman que el etanol posee un efecto negativo sobre la expresión de este receptor. Además, el etanol potencia la expresión del receptor CB₂ y de GPR55 en estas células. Asimismo, se observa un incremento en la expresión de citocinas proinflamatorias debido a la exposición al etanol. El bloqueo de los receptores CB₂ y GPR55 da como resultado un potenciación todavía mayor de la expresión de citocinas proinflamatorias, lo que sugiere un efector neuroprotector de los receptores CB₂ y GPR55 (427).

La exposición al etanol no induce cambios únicamente en la expresión de los receptores cannabinoides. También puede verse afectada su señalización. Por ejemplo,

un estudio sobre el receptor CB₁ en el hígado demostró que este receptor regula la síntesis de ácidos biliares. Este proceso implica la activación del factor de la transcripción CREB como resultado de la activación de CB₁R. La exposición al etanol de las células hepáticas incrementa la síntesis de ácidos biliares, transaminasas y también aumenta la actividad de CREB, que a su vez es responsable de la transcripción de genes de las enzimas hepáticas encargadas de la síntesis de ácidos biliares. De forma interesante, en este mismo estudio comprobaron que la insulina ejerce un efecto protector frente a la desregulación en la síntesis de ácidos biliares. A este nivel, CB₁R y CREB son interesantes dianas terapéuticas en la protección del hígado en individuos alcohólicos (428).

El etanol también puede afectar la síntesis de hormonas a través de la activación del sistema endocannabinoide, como es el caso de la hormona luteinizante. La anandamida bloquea la liberación de la hormona luteinizante, y en presencia de etanol este efecto se ve reforzado mediante la activación del receptor CB₁ (429). El etanol puede causar cambios epigenéticos que afectan la expresión genética. Por ejemplo, en ratones P7, el etanol promueve la acetilación de la histona H4 en la posición Lys8 en el exón 1 del gen CNR1, que codifica para CB₁R en el hipocampo y en la neocorteza. En esta región el etanol también disminuye la fosforilación del factor de la transcripción CREB. De esta forma el etanol causa un aumento en la expresión de CB₁R y una afectación de la transcripción genética que provoca alteraciones en la memoria espacial y social en los animales (430). Otro estudio llevado a cabo en el hipocampo de ratas sometidas a un tratamiento intermitente de consumo alcohólico muestra una disminución inicial de la expresión de CB₁R en el hipocampo, seguido de un incremento en su expresión a largo plazo, acompañado de un aumento de los niveles de endocannabinoides. Este fenómeno podría ser el responsable de algunos de los déficits cognitivos observados en individuos alcohólicos (431). En las células granulosas del cerebelo, la exposición aguda a etanol causa un aumento en los niveles de anandamida disponibles a causa de la inhibición en el transporte de este endocannabinoide. Por el contrario, la exposición crónica a etanol parece ejercer el efecto opuesto, lo que sugiere que el transporte de anandamida podría jugar un papel importante en la tolerancia a largo plazo al etanol (175). En ratones inmaduros, la exposición a etanol provoca disfunción sináptica. La exposición temprana causa un aumento en la expresión de CB₁R en corteza e hipocampo, así como un aumento en los niveles de anandamida, pero no en los de 2-AG. La expresión de enzimas de síntesis de anandamida también está potenciada. La activación de CB₁R en presencia de etanol en estos animales disminuye la activación de la vía de ERK1/2 y potencia la degeneración neuronal. Este proceso está implicado en la aparición de los síntomas del síndrome alcohólico fetal (432). La activación del receptor CB₂ ejerce un efecto protector frente a la pérdida neuronal en las regiones neurogénicas de ratones adultos con dependencia alcohólica. El tratamiento con el agonista específico de CB₂R, JWH133, evita la neurodegeneración observada en la zona subgranular del giro dentado, la zona subventricular de los ventrículos laterales y el hipotálamo que se produce por la exposición a etanol (433).

La neurotransmisión corticoestriatal también está afectada como consecuencia de la interacción del etanol con el sistema endocannabinoide. Las corrientes postsinápticas excitatorias corticoestriatales están inhibidas durante la exposición al etanol. El antagonismo del receptor CB₁ recupera estas corrientes, lo que demuestra que la activación del receptor CB₁ durante el consumo agudo de bebidas alcohólicas está

involucrado en el proceso (434). En amígdala, en la región basolateral, la exposición a etanol y la señalización del sistema endocannabinoide muestran un efecto antagónico que podría guardar relación con los comportamientos de búsqueda y consumo de bebidas alcohólicas en individuos dependientes (435). También se ha relacionado al sistema endocannabinoide y la neuroinflamación en los efectos a nivel emocional en la exposición intermitente a etanol. En animales en período de abstinencia se producen comportamientos ansiogénicos y alteraciones en memoria, acompañados de un incremento en la expresión de enzimas de síntesis de endocannabinoides en corteza prefrontal media, mientras que en la amígdala los niveles de expresión están reducidos. En estriado también se produce una reducción en la expresión de CB₁R y CB₂R. Además, la expresión de citocinas proinflamatorias está aumentada en corteza prefrontal media (436). En conjunto, todas estas evidencias remarcan el importante papel que juega el sistema endocannabinoide durante el consumo tanto agudo como crónico de bebidas alcohólicas, y manifiestan la necesidad de investigar y desarrollar nuevas terapias frente al alcoholismo y sus efectos colaterales, que tengan como diana terapéutica al sistema endocannabinoide.



OBJETIVOS

2. Objetivos

El sistema endocannabinoide se compone de los receptores de cannabinoides CB₁ y CB₂ y de los enzimas de síntesis y degradación de los compuestos de origen lipídico que actúan como ligandos endocannabinoides. Al igual que otros GPCR, los receptores de cannabinoides pueden formar heterómeros, modificando la ya de por sí compleja farmacología cannabinoide. La implicación del sistema endocannabinoide en enfermedades neurodegenerativas está bien descrita. En esta clase de enfermedades tienen lugar procesos neuroinflamatorios, que cursan con activación de las células de la microglía y en los que la actividad del sistema endocannabinoide juega un papel inmunomodulador, cuyo principal objetivo es contrarrestar la inflamación. Por ejemplo, ha podido determinarse que la activación de los receptores de cannabinoides en determinadas condiciones de neuroinflamación reduce la síntesis de citocinas proinflamatorias. Teniendo en cuenta estos antecedentes, el primer y el segundo objetivo de esta tesis han sido los siguientes:

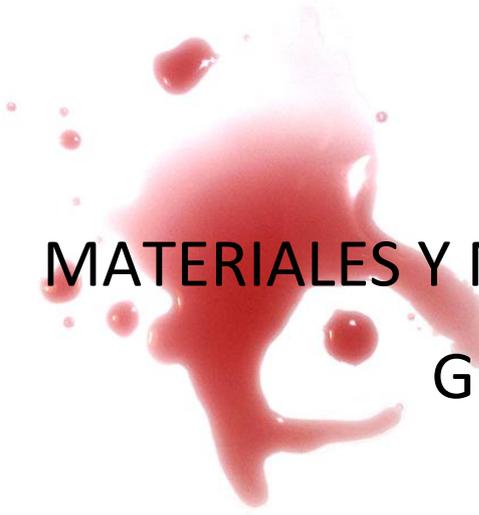
Objetivo 1. Detectar los cambios en los receptores CB₁ y CB₂ de cannabinoides, así como en la formación del heterómero CB₁R/CB₂R en microglía activada.

Objetivo 2. Desvelar la relevancia fisiológica de los receptores cannabinoides y la expresión y señalización del heterómero en células microgliales activadas.

El sistema endocannabinoide también se encuentra implicado en la adicción a distintas sustancias de abuso. La activación de los receptores CB₁ y CB₂ ha sido relacionada con un incremento en la búsqueda y consumo de sustancias como el alcohol en animales de experimentación. Además, la expresión de los receptores de cannabinoides, así como la del receptor GPR55 se encuentra alterada en pacientes alcohólicos. Por lo tanto, el sistema endocannabinoide es una interesante diana terapéutica para el desarrollo de fármacos orientados al tratamiento tanto de la adicción como de los efectos deletéreos del etanol en el sistema nervioso central. Con estos precedentes, los objetivos tercero y cuarto de esta tesis han sido los siguientes:

Objetivo 3. Identificar los cambios en la heteromerización de los receptores CB₂ y GPR55 ejercidos por el etanol.

Objetivo 4. Identificar los cambios en la señalización celular de CB₂R y GPR55 ejercidos por el etanol en células transfectadas y cultivos primarios de hipocampo.

A graphic of a red ink splatter, consisting of a large central blot and several smaller droplets scattered around it, positioned behind the text.

**MATERIALES Y MÉTODOS
GENERALES**

3. Materiales y métodos generales

3.1. Vectores de expresión y proteínas de fusión

Se utilizaron cDNAs que codifican para los receptores de estudio (humanos) clonados en el vector de expresión pcDNA3.1 (Invitrogen™ Life technologies, Waltham, Massachusetts, E.E.U.U.) (Figura 1B). El DNA de los receptores se amplificó sin el codón de parada empleando cebadores específicos sentido y antisentido que contienen sitios de restricción para los enzimas HindIII y BamHI o BamHI y KpnI. Posteriormente, los fragmentos obtenidos se clonaron en pauta de lectura con las proteínas Rluc, YFP o GFP² en los sitios de restricción HindIII y BamHI en el vector que contiene la secuencia de Rluc (Perkin-Elmer®, Wellesley, MA, E.E.U.U.) (Figura 1C) o BamHI y KpnI en vectores que contienen la secuencia de YFP (Clontech laboratories inc., Heidelberg, Alemania) (Figura 1A) y GFP² (Clontech laboratories inc.) (Figura 1B). Con este proceso se obtuvieron plásmidos que expresaban los receptores fusionados a Rluc, YFP o GFP² por su extremo carboxilo terminal.

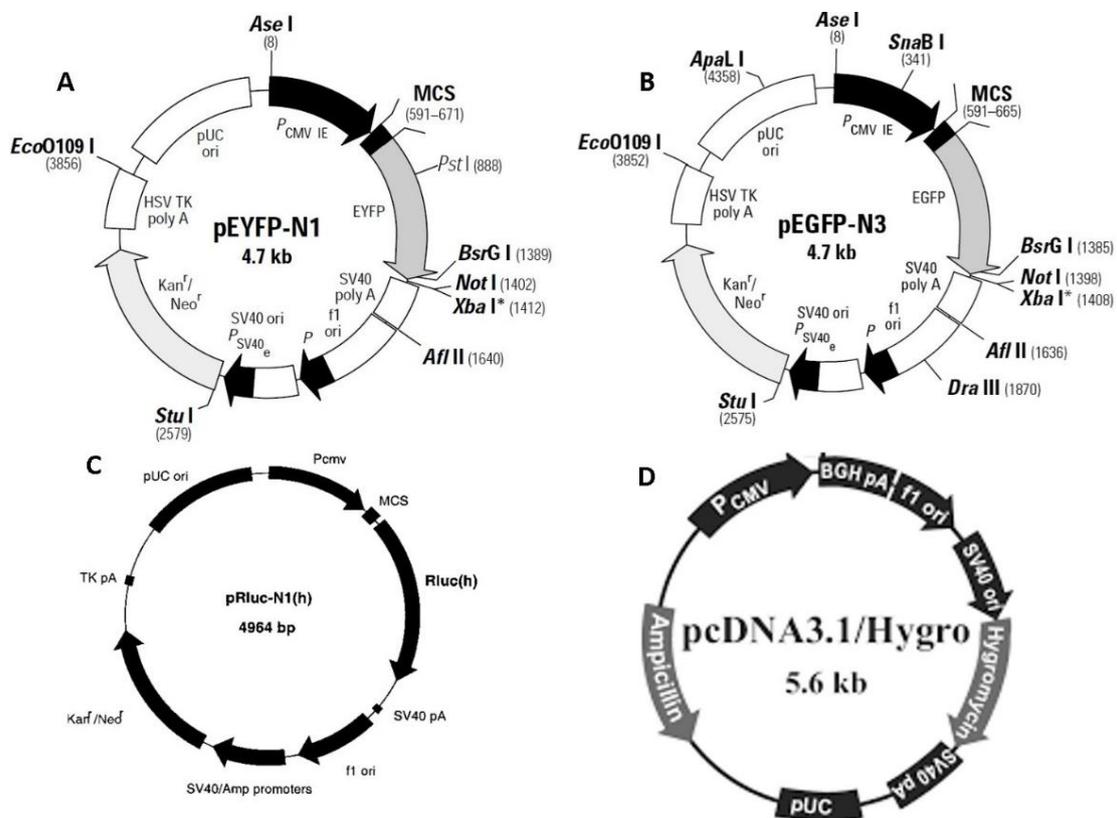


Figura 1. Mapa de los plásmidos empleados. A, plásmido con la secuencia de la proteína YFP (Clontech laboratories inc.); B, plásmido con la secuencia de la proteína GFP² (Clontech laboratories inc.); C, plásmido con la secuencia de la enzima *Renilla* luciferasa (Perkin-Elmer); D, plásmido pcDNA3.1 que carece de *Tag* (Invitrogen™ Life technologies).

3.2. Reactivos

El LPS y el interferón- γ (IFN- γ) se adquirió de Sigma-Aldrich (San Louis, Missouri, E.E.U.U.) y el 2 -Araquidonilglicerol, anandamida, ACEA, rimonabant, JWH133, CP55940 y AM630 de Tocris Bioscience (Bristol, R.U.). El LPI se adquirió de Merck/Millipore (Billerica, Massachusetts, E.E.U.U.).

3.3. Ensayo de viabilidad celular

El porcentaje de supervivencia celular se calculó contando células vivas y muertas con un contador de células automatizado Countless II FL automated cell counter (Thermo Fisher Scientific-Life Technologies, Waltham, Massachusetts, E.E.U.U.) tras diluir las células con azul de tripán (1:1 v/v).

3.4. Generación del modelo de la enfermedad de *Parkinson* (PD), tratamiento con levodopa y evaluación de la discinesia

Se utilizaron ratas *Wistar* macho. Todos los experimentos se realizaron en conformidad con las directivas de la UE (2010/63/UE y 86/609/CEE) y fueron aprobados por el comité de ética de la universidad de Santiago de Compostela. Los animales se dividieron en tres grupos como sigue: ratas no lesionadas, animales lesionados con 6-hidroxidopamina (6-hidroxi-DA) que recibieron un tratamiento con vehículo, y animales lesionados que recibieron un tratamiento crónico con levodopa. Los detalles sobre la generación del modelo, el protocolo de administración de fármacos y el análisis de comportamiento se describen en Farré et al., 2015 (437). En resumen, se realizó una cirugía en ratas anestesiadas con ketamina/milazina (1% de ketamina, 75 mg/kg y 2% de xilazina, 10 mg/kg). Se produjeron lesiones en el haz del prosencéfalo medial derecho para lograr una lesión unilateral completa de la vía nigroestriatal. A las ratas se les ha inyectado 12 μ g de 6-hidroxi-DA (Sigma-Aldrich) en 4 μ L de suero salino estéril que contiene 0,2 % de ácido ascórbico. Las coordenadas estereotácticas han sido las siguientes: 3,7 mm posterior al bregma, 1,6 mm lateral a la línea media y 8,8 mm ventral al cráneo en la línea media. La barra dentada se ajustó a 3,3 mm. La solución se inyectó usando una jeringa Hamilton de 5 μ L acoplada a un inyector motorizado (Stoelting), a una velocidad de 0,5 μ L/min, y la cánula se mantuvo *in situ* 2 min después de la inyección. Tres semanas después de la cirugía, la eficacia de la lesión se evaluó mediante la prueba de rotación por anfetamina y la prueba de cilindro. La extensión de la lesión se verificó finalmente por análisis de la tirosina hidroxilasa mediante *Western Blot*. La lesión nigroestriatal se confirmó por la pérdida de tirosina hidroxilasa (TH) mediante tinción inmunohistoquímica.

La rotación inducida por anfetamina se probó en un aparato Rota-count 8 (Columbus Instruments, Columbus, OH, E.E.U.U.) monitorizando giros completos de cuerpo (360°) en cualquier dirección. Se registraron los giros de cuerpo completo hacia la izquierda o la derecha durante 90 min después de una inyección de D-anfetamina (2,5 mg/kg, i.p.) disuelta en solución salina. Las ratas que mostraron más de seis giros/min ipsilaterales a la lesión se incluyeron en el estudio; esta tasa corresponde a una depleción de más de un 90% de las fibras de dopamina en el estriado (438).

El uso espontáneo de miembros anteriores se evaluó mediante la prueba de cilindros (439). Las ratas se colocaron individualmente en un cilindro de vidrio (20 cm de diámetro), y el número de contactos con la pata delantera izquierda o derecha se anotaron por un observador ciego a la identidad de los animales, y fueron presentados como el porcentaje de toques con la pata izquierda alterados con respecto al total. Un animal control obtendría una puntuación imparcial del 50%, mientras que la lesión generalmente reduce el rendimiento de la pata alterada a menos del 20% de los contactos totales con la pared. Los animales tratados con levodopa han recibido una inyección subcutánea diaria con una dosis del éster metílico de levodopa (6 mg/kg) más benserazida (10 mg/kg) durante 3 semanas (este tratamiento induce de forma fiable movimientos discinéticos). Con el fin de discriminar animales discinéticos de no discinéticos, la manifestación de AIMS inducidos por levodopa (movimientos involuntarios) se evaluó de acuerdo con la escala de discinesia en rata descrita en detalle anteriormente (440) (441). La severidad de cada uno de los subtipos de AIM (miembro, orolingual y axial) se evaluó utilizando puntuaciones de 0 a 4 (1, ocasionales, es decir, presentes menos del 50% del tiempo; 2, frecuentes, es decir, presentes más del 50% del tiempo; 3, continuos, pero interrumpidos por fuertes estímulos sensoriales; 4, continuos, no interrumpidos por fuertes estímulos sensoriales). Las ratas se clasificaron como discinéticas si mostraban una puntuación de ≥ 2 por período de monitorización en al menos dos tipos diferentes de AIM. Los animales se clasificaron como no discinéticos si no exhibían AIMS o estos eran leves/ocasionales (442). Los animales con puntuaciones bajas se descartaron.

3.5. Ratón transgénico APP modelo de la enfermedad de Alzheimer (AD)

Los ratones transgénicos APP_{Sw, Ind} (línea J9, fondo C57BL / 6) que expresan APP695 humana que alberga el FAD-linked, que contiene la variante K670 N/M671 L e Indiana (V717 F) en el promotor de PDGF β , se obtuvieron mediante el cruce de ratones APP_{Sw, Ind} y de ratones no transgénicos (WT) (443).

3.6. Producción de oligómeros de A β

La preparación y prueba de oligómeros de A β se realizó como está descrito en el trabajo realizado por Röncke y colaboradores (444). En resumen, el péptido A β ₁₋₄₂ liofilizado se disolvió en 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP, Sigma-Aldrich) a 0,5 mg/mL. La solución se repartió en alícuotas. Tras la evaporación del HFIP, el péptido se guardó a -80 °C. 24 horas antes de su uso, el péptido se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich), se sonicó, y se redisolvió en medio F12 (Gibco) a una concentración de 5 μ M. Finalmente, se mantuvo a 4 °C durante 24 horas hasta su oligomerización (445). En cada experimento se utilizaron preparaciones de péptido A β ₁₋₄₂ frescas. La calidad de las preparaciones se verificó mediante electroforesis en gel SDS-PAGE (gel de Tricina al 10%) y *western-blot* empleando anticuerpos específicos frente a la región amino terminal del péptido A β -82E1 (1:1000, IBL, Cat. 10323) (ver (444)).

3.7. Producción de óxido nítrico (NO)

Para la detección de NO, se colocaron 60.000 células/pocillo en placas transparentes Deltalab de 96 pocillos y se incubaron durante 48 horas con diferentes concentraciones de LPS e IFN- γ o con vehículo. Una fracción de los sobrenadantes (50 μ L) se recolectó y se analizó la producción de NO mediante el uso del reactivo de Griess (Promega). La absorbancia se midió a 540 nm usando un espectrofotómetro Multiskan Ascent (Thermo labsystems).

3.8. Cultivos celulares y transfección

En los experimentos se utilizaron células HEK-293T, que proceden de riñón de embrión humano. Las células HEK-293T se cultivaron en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco® by life technologies™, Maryland, E.E.U.U.) suplementado con L-Glutamina 2 mM, ampicilina 50 μ g/mL, estreptomicina 50 μ g/mL y 5% de suero fetal bovino (FBS) con el sistema del complemento inactivado por calor. Todos los productos son de Gibco® by life technologies™. Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda con un 5% de CO₂. Posteriormente, las células se transfectaron transitoriamente con los cDNAs correspondientes, utilizando NaCl 150 mM, polietilenimina (PEI, Sigma-Aldrich) 2 μ M no ramificada y medio DMEM sin suplementar, tal y como se describe en Carriba et al., 2008 (446). Pasadas 4 horas la mezcla de transfección se reemplazó por medio DMEM suplementado. Las células transfectadas se emplearon en los correspondientes experimentos 48 horas después del procedimiento de transfección. Los cultivos primarios de neuronas del hipocampo se obtuvieron de fetos de rata *Sprague-Dawley* (día embrionario 19). Las células se aislaron como se describe en Hradsky et al., 2013 (447). Las células se mantuvieron en medio neurobasal suplementado con L-glutamina 2 mM, ampicilina 50 μ g/mL, estreptomicina 50 μ g/mL y 2% de suplemento de B27 durante 12 días hasta su uso en el experimento correspondiente. De nuevo todos los productos que se utilizaron son de la marca Gibco® by life technologies™.

Las células N9 microgliales se cultivaron en medio RPMI (Gibco®) suplementado con L-Glutamina 2 mM, ampicilina 50 μ g/mL, estreptomicina 50 μ g/mL y 5% de suero fetal bovino (FBS) con el sistema del complemento inactivado por calor. Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO₂. En caso necesario, las células se transfectaron transitoriamente empleando el método de polietilenimina, PEI (448). Para preparar los cultivos primarios de microglía de estriado, se retiró el cerebro de ratones C57BL /6 de 2-4 días de edad. Las células microgliales se aislaron siguiendo protocolos descritos con anterioridad en Pulido-Salgado et al., 2017 (449) y se cultivaron en placas de 6 pocillos (Corning®, Nueva York, E.E.U.U.) en medio DMEM (Gibco®) suplementado con L-Glutamina 2 mM, ampicilina 50 μ g/mL, estreptomicina 50 μ g/mL y 5% de suero fetal bovino (FBS) con el sistema del complemento inactivado por calor. Para llevar a cabo la RT-PCR los cultivos gliales se trataron con tripsina diluida siguiendo el procedimiento descrito en Saura et al., 2003 (450) para obtener una pureza superior al 98% de células gliales. Para otros ensayos las células se sembraron en placas de 6 pocillos (Corning®) o en placas de 96 pocillos con fondo de poli-D-lisina (Corning®) con una densidad de 50.000 células/pocillo. Los cultivos primarios de neuronas del núcleo hipotalámico se obtuvieron de fetos de rata *Sprague-Dawley* (día embrionario 19). Las

células se aislaron como se describe en Hradsky et al., 2013 (447). Las células se mantuvieron en medio neurobasal suplementado con L - Glutamina 2 mM, ampicilina 50µg/mL, estreptomicina 50µg/mL y 2% de suplemento de B27 durante 12 días hasta su uso en el experimento correspondiente. De nuevo todos los productos que se utilizaron son de la marca Gibco® by life technologies™.

3.9. Tratamiento con etanol

Las células HEK-293T transfectadas o los cultivos primarios de neuronas de hipocampo se trataron con etanol a una concentración final equivalente a 1.5 g/L de etanol en sangre (32,5 mM). En total se llevaron a cabo tres pretratamientos independientes consistentes en tres tiempos distintos antes de cada experimento: Un pretratamiento de treinta minutos, dos horas o dos días antes del procedimiento experimental en células HEK-293T transfectadas, o de treinta minutos, dos horas o 6 días antes del experimento con cultivos primarios.

3.10. Inmunohistoquímica

Para los ensayos de inmunohistoquímica las células se sembraron en placas de 12 pocillos (Corning®) a las que se les colocaron cubreobjetos de cristal en el fondo. Las células se mantuvieron en incubación a 37°C y en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ hasta su transfección 24 horas después. Para la transfección se utilizó el cDNA para los receptores de estudio fusionados a YFP, Rluc o sin fusionar. 48 horas después de la transfección las células se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 15 minutos y se lavaron con PBS (NaCl, 138 mM, KCl, 3 mM, Na₂HPO₄, 8,1 mM, K₂ HPO₄, 1,5 mM) que contenía glicina (20 mM) para inactivar los grupos aldehído antes de la permeabilización con PBS-glicina y detergente Tritón X-100 (0,2 %) durante 5 minutos. Las células HEK-293T y N9 se trataron durante 1 hora con PBS-glicina con albúmina de suero bovino (BSA) al 1% y se incubaron durante una hora con los siguientes anticuerpos: anti-iba1 de conejo (1/100; Sigma-Aldrich), anti-CB₁R de cabra (1/100, Santa Cruz Technologies, Dallas, Texas, E.E.U.U.) y/o anti-CB₂R de conejo (1/100, Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, E.E.U.U.) para células N9, y anti-Rluc de ratón (Chemicon-Millipore corp) durante una hora más para células N9 y HEK-293T. Posteriormente, las muestras se trataron con anticuerpos secundarios Alexa flúor 488-conjugado frente a cabra (1/200, Invitrogen (verde), células N9) y anticuerpo frente a ratón o frente a conejo conjugado con Cy3 (1/200, Jackson ImmunoResearch, Baltimore, E.E.U.U. (rojo), células N9 y HEK-293T) durante una última hora. Las células gliales activadas se detectaron mediante el uso de anticuerpos primarios de Abcam (Anti-MHC Clase II [MRC OX-6] Ab23990 (1/100)) en muestras de ratas, y Ab180779 (1/100) en muestras de ratones) y anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos. Posteriormente, las muestras se lavaron varias veces y se montaron con Mowiol al 30% (Calbiochem, Merck/Millipore). Las muestras se observaron en un microscopio confocal Leica SP2 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Escala: 5 µm. La fluorescencia se cuantificó con el software Fiji-Image J.

3.11. Ensayo de BRET

Para llevar a cabo el ensayo de BRET las células HEK-293T o N9 se sembraron en placas de 6 pocillos (Corning®) y se mantuvieron en incubación a 37°C y atmósfera húmeda con 5% de CO₂ hasta su transfección 24 horas más tarde. Las células HEK-293T o N9 se transfectaron transitoriamente con una cantidad constante de cDNA que codifica para CB₁R-Rluc (células N9) o GPR55 (células HEK-293T) y con cantidades crecientes de cDNA que codifica para CB₂R-GFP² o D₁R-GFP² (células N9) o CB₂R-YFP (células HEK-293T). 48 horas tras la transfección las células se lavaron con tampón HBSS (*Hank's balanced salt solution* que contiene: NaCl, 137 mM, KCl, 5 mM, Na₂HPO₄, 0,34 mM, KH₂PO₄, 0,44 mM, CaCl₂, 126 mM, MgSO₄, 0,4 mM, MgCl₂, 0,5 mM y HEPES. 10 mM, pH 7,4) y se ajustaron a 2 mg/mL de proteína mediante un ensayo de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hércules, California, E.E.U.U.) utilizando albúmina de suero bovino como patrón. Para cuantificar la expresión de GFP², la fluorescencia se leyó en un FluoStar Optima Fluorimeter (BMG, Labtechnologies, Offenburg, Alemania) equipado con una lámpara de Xenón de alta energía y utilizando un filtro de excitación con un ancho de banda de 10 nm, excitando a 400 nm. Para cuantificar la expresión de YFP, la fluorescencia se leyó en un aparato MITHRAS LB 940 HTS III *multimode reader* (BERTHOLD Technologies) excitando a 485 nm. La medición de la fluorescencia se llevó a cabo en placas de 96 pocillos negras con fondo transparente (Porvair Sciences Ltd, Leatherhead, R.U.). La fluorescencia se determinó como la resta de la emisión de las células transfectadas con proteína fluorescente y la emisión de las células transfectadas solo con Rluc. Para las mediciones de BRET² se recogieron lecturas 30 segundos después de la adición de 5 µl de DeepBlueC (Molecular Probes, Eugene, OR) utilizando un MITHRAS LB 940 HTS III *multimode reader* (BERTHOLD Technologies) y recogiendo la señal emitida a 510 nm. Para las mediciones de BRET se recogieron lecturas un minuto después de la adición de coelenterazina H (P.J.K. GmbH, Kleinblittersdorf, Alemania) utilizando de nuevo un aparato MITHRAS LB 940 HTS III *multimode reader* recogiendo las señales a 535 nm. Para cuantificar la luminiscencia del receptor fusionado con Rluc, se llevó a cabo una lectura a los 10 minutos tras la adición de la coelenterazina 5 µM. El BRET² se expresó como mili unidades de BRET² (mBU, (Emisión₅₁₀/Emisión₃₉₅) X 1000). El BRET se expresó como mili unidades de BRET (mBU, (Emisión₅₃₀/Emisión₄₈₅) X 100).

3.12. Ensayo de ligación *in situ* por proximidad (PLA)

Las células N9 y los cultivos primarios microgliales se cultivaron sobre cubres de vidrio y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos, se lavaron con PBS-glicina 20 mM para inactivar los grupos aldehído y se permeabilizaron con PBS-glicina que contiene Tritón X-100 al 0,2% durante 5 minutos. Después las células se incubaron durante una hora a 37 °C con una solución de bloqueo. Las secciones congeladas de cerebro se descongelaron a 4 °C en tampón Tris-HCl 50 mM, y se permeabilizaron con TBS que contiene Tritón X-100 al 0,01% durante 10 min y se lavaron con TBS. Las muestras se trataron con anticuerpos primarios específicos contra los receptores CB₁ y CB₂ (anti-CB₁R de cabra 1/100 y anti-CB₂R de conejo respectivamente, de Santa Cruz Technologies y Cayman Chemical) y se procesaron utilizando sondas de PLA que detectan anticuerpos de conejo y cabra (sonda Duolink II PLA frente a conejo plus y sonda Duolink II PLA frente a cabra minus). Los núcleos se marcaron con Hoechst (1/200;

Sigma-Aldrich). Los cortes de cerebro humano de la corteza frontal de pacientes alcohólicos y controles se desparafinaron previamente con Xileno (100%) durante 20 minutos. Posteriormente se llevaron a cabo lavados secuenciales primero con etanol al 100%, después al 90%, seguido de un lavado con etanol al 60 % y finalmente agua. Por último, se llevó a cabo un tratamiento con tampón citrato pH 6,0 que contiene Tween-20 al 0,05% durante 20 minutos a 100 °C. Esto permite desenmascarar antígenos del tejido. Finalmente, las muestras se rehidrataron en agua durante 5 minutos. Posteriormente se trataron con PBS que contenía Tritón X-100 al 0,01% durante 10 min y se lavaron con PBS antes de usar los anticuerpos primarios específicos para los receptores CB₂ y GPR55 (monoclonal anti-CB₂R 1/100 de ratón y anti-GPR55 de conejo, respectivamente, de Santa Cruz Technologies y Cayman Chemical). La PLA se llevó a cabo con sondas que detectan anticuerpos de conejo o de ratón (sonda Duolink II PLA frente a conejo plus y sonda Duolink II PLA frente a ratón minus). Los núcleos se marcaron con Hoechst (1/200; Sigma-Aldrich). Las muestras se montaron con Mowiol al 30% (Calbiochem). Finalmente, las muestras se observaron en un microscopio confocal Leica SP2 (Leica Microsystems) equipado con un objetivo de inmersión en aceite 63X apocromático (N.A. 1.4) y líneas láser de 405 nm y 561 nm. En cada campo se tomaron imágenes en dos canales diferentes, uno para cada marcaje (azul para los núcleos, rojo para los heterómeros), y siguiendo el eje Z, con una distancia entre imágenes de un micrómetro. El número de células que contienen uno o más puntos rojos frente al total de células (número de núcleos en azul) y la ratio (r, número de puntos rojos/célula) en las células que contienen puntos, se determinó mediante el software Duolink Image.

3.13. PCR en tiempo real

Se extrajo y se aisló el RNA total de cultivos de microglía tratados durante 48 horas con vehículo (medio de cultivo celular) o LPS con o sin IFN- γ mediante lisado de las células microgliales sembradas en *Flasks* de 75 cm² (Corning®) con 1 mL de TriReagent (Sigma-Aldrich) y 100 mL de 1-bromo-3-cloropropano (BCP, Sigma-Aldrich). La fase acuosa que contenía el RNA total se recuperó después de centrifugar 15 min a 12.000 g y 4 °C, y se mezcló con un volumen igual de etanol frío al 70% y se cargó en una columna PureLink™ Micro Kit (Invitrogen). El RNA total se purificó después siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA total se cuantificó espectrofotométricamente utilizando un *Nano Drop* ND-1000 (Thermo Scientific) y su integridad y la calidad se evaluaron con el sistema Bioanalyzer 2100 (Agilent, Santa Clara, California, E.E.U.U.). El RNA total (1 μ g) se transcribió inversamente de forma aleatoria mediante cebado aleatorio utilizando la transcriptasa inversa M-MLV, la RNasa H *minus*, mutante puntual, siguiendo el protocolo de “*Two-Step* RT-PCR” proporcionado por Promega (Promega, Madison, WI, EE. UU.).

El cDNA monocatenario obtenido se usó en una PCR para CB₁R, CB₂R y GAPDH como control interno usando la *Taq* DNA polimerasa (Promega). Se emplearon dos cebadores de CB₁R de rata, un *forward*, 5'-CATCCAGTGTGGGAGAAT-3' y un cebador *reverse* 5'-TATGGTCCACATCAGGCAA-3'. Para amplificar CB₂R, se empleó como cebador *forward* 5'-CATCACTGCCTGGCTCACT-3' y como cebador *reverse* 5'-AGCATAGTCCTCGGTCCTCA-3'. Para amplificar GAPDH los cebadores que se utilizaron fueron 5'-CATCCTGCACCACCACTGCTTAG-3' (*forward*) y 5'-GCCTGCTTCACCACCTTCTTGATG-3'

(reverse). El RNA sin transcripciones inversas no produjo amplicones, lo que indica que no hubo contaminación con DNA genómico.

3.14. Determinación de cAMP intracelular

Para llevar a cabo la determinación de cAMP intracelular las células N9, HEK-293T o los cultivos primarios se sembraron en placas de 6 pocillos (Corning®) y se mantuvieron en incubación a 37°C y atmósfera húmeda de 5% de CO₂ hasta su transfección 24 horas después (células N9 o HEK-293T) o hasta su uso días después (cultivos primarios). La transfección se llevó a cabo empleando el cDNA de los receptores de estudio. 2 horas antes del procedimiento experimental, se cambió el medio de las células por medio DMEM (Gibco®) sin suplementar. Este procedimiento evita la interacción entre componentes del FBS y las células que puedan dar lugar a variaciones en los niveles de cAMP intracelular. Tras esto, las células se levantaron y se resuspendieron en medio de cultivo DMEM que contiene HEPES 5mM, Zardaverina 32 µM y BSA 0,1%, PH 7,4. Las células se colocaron en microplacas de 384 pocillos (2.500 células/pocillo), se pretrataron con los correspondientes antagonistas/vehículo durante 15 minutos, y se estimularon con los agonistas selectivos durante 15 minutos más antes de añadir Forskolina 5 µM o vehículo durante otros 15 minutos. Las lecturas se realizaron 1 hora después de la incubación con anticuerpos específicos para cAMP a 25 °C. Las medidas de la transferencia homogénea de energía fluorescente resuelta en el tiempo (HTRF) se realizaron con un kit LANCE® *Ultra cAMP* (Perkin-Elmer®). Este kit precisa el uso de placas de 384 pocillos. El principio en el que se fundamenta el ensayo de determinación de cAMP intracelular es un TR-FRET entre el cAMP del kit marcado con europio excitado a una λ de entre 320 y 340 nm y que emite a una λ de 615 nm, y el fluoróforo de los anticuerpos frente a cAMP capaz de absorber la energía de emisión del Eu y emitir a una λ de 665 nm (Figura 2). El ensayo consiste en una competición por la unión al anticuerpo marcado con el fluoróforo entre el cAMP marcado con Eu y el cAMP intracelular, que provoca cambios en la señal de TR-FRET. El resultado se expresa como el porcentaje de disminución en el nivel de cAMP intracelular con respecto al 100% representado por el tratamiento solo con forskolina. La fluorescencia se analizó a 665 nm con un lector de microplacas PHERAstar Flagship equipado con un módulo óptico para HTRF (BMG Lab Technologies, Offenburg, Alemania).

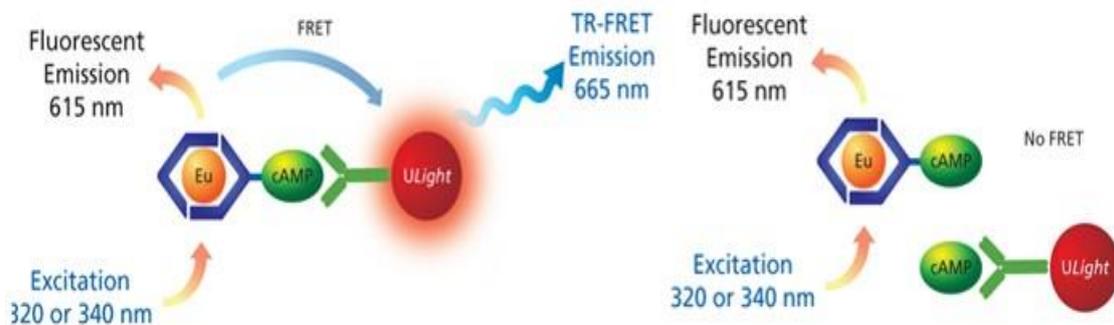


Figura 2. Fundamento del ensayo de determinación de cAMP intracelular. Extraído de LANCE® *Ultra cAMP* (Perkin-Elmer®).

3.15. Detección de pERK1/2

Para determinar la fosforilación de ERK1/2 se sembraron las células en microplacas transparentes de 96 pocillos Deltalab a una concentración de 40.000 células/pocillo y se incubaron durante 24 horas. Entre 2 y 4 horas antes del experimento, el medio de cultivo empleado se reemplazó por medio DMEM sin suplementar. Tras esto las células se trataron a 25 °C durante 10 minutos con vehículo o con los agonistas específicos. Las células se lavaron con PBS frío antes de añadir tampón de lisis (tratamiento de 20 minutos). 10 µL de cada sobrenadante obtenido en la lisis se colocaron en una placa ProxiPlate de 384 pocillos. La fosforilación de ERK1/2 se determinó utilizando el kit AlphaScreen SureFire (Perkin Elmer) siguiendo las instrucciones del proveedor. Se añadió el reactivo del kit que contiene anticuerpos frente a pERK marcados con un fluoróforo. Dos horas después se añadió un segundo reactivo del kit que contiene otro anticuerpo frente a pERK marcado con estreptavidina. El principio en el que se fundamenta este ensayo es un TR-FRET entre la molécula donadora de un anticuerpo y la molécula aceptora del otro (Figura 3). La lectura se llevó a cabo con un aparato EnSpire Multimode Plate Reader (Perkin-Elmer). El resultado se expresa como el porcentaje del aumento o disminución de pERK respecto a las células sin tratar.

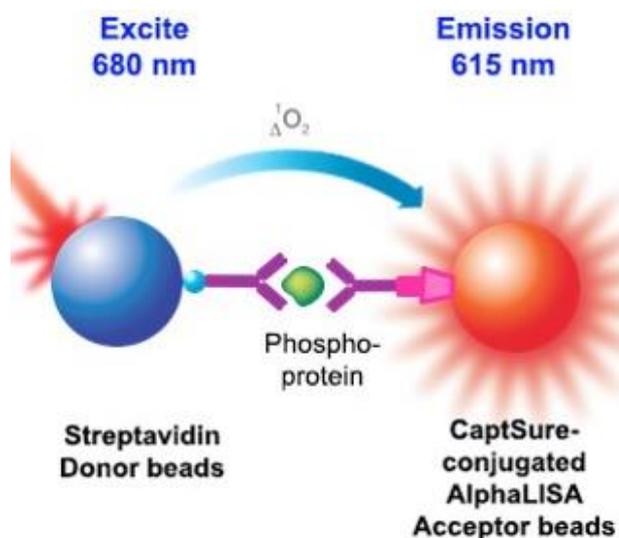


Figura 3. Fundamento del ensayo de detección de pERK. Extraído de AlphaLISA SureFire ULTRA ERK1/2.

3.16. Ensayo de Distribución Dinámica de Masa (DMR)

Para el ensayo de Distribución Dinámica de Masa (DMR) con células N9, microglía, células HEK-293T o neuronas de hipocampo de rata, las células se sembraron en placas de 384 pocillos con microsensores (Perkin-Elmer) con una concentración de 10.000 células por pocillo y se mantuvieron en incubación a 37 °C y 5% de CO₂. La distribución dinámica de masa (DMR) inducida por activación de un receptor se detectó mediante iluminación con luz policromática en la parte inferior de la placa, donde se localizan biosensores que miden cambios en la longitud de onda de la luz monocromática reflejada, que es una función del índice de refracción. La magnitud de esta longitud de onda (picómetros) es directamente proporcional a la cantidad de DMR. Antes del ensayo las células se lavaron dos veces con HBSS que lleva HEPES 20 mM, DMSO 0,1 %, pH 7,15,

y se incubaron durante 2 horas con este mismo tampón (24 °C, 30 µL/pocillo). Tras esto la placa se escaneó y se registró la señal basal durante 10 minutos antes de añadir 10 µL de los antagonistas específicos durante 30 minutos, seguido de la adición de 10 µL de los agonistas específicos. Todos los compuestos del ensayo se disolvieron en el tampón previamente descrito. La DMR se registró durante al menos 5.000 segundos en un aparato EnSpire Multimode Plate Reader (Perkin-Elmer). Los resultados se analizaron usando el *software* EnSpire Workstation v 4.10.

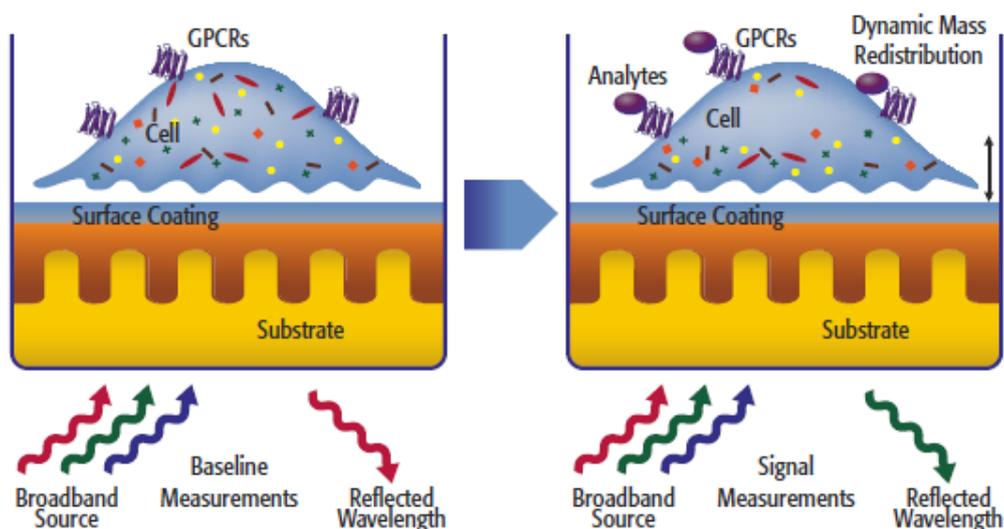


Figura 4. Fundamento de la técnica de DMR. Extraído de *Drug Discovery & Development*.

3.17. Ensayo de movilización de calcio

Para llevar a cabo el ensayo de movilización de calcio intracelular, las células HEK-293T se transfectaron transitoriamente con cDNA que codifica para GPR55 y para CB₂R, así como para el sensor de calcio modificado GCaMP6 (Addgene, Cambridge, Massachusetts, E.E.U.U.), que contiene la secuencia de la proteína fluorescente cpGFP, de la proteína calmodulina y del péptido *CaM-interacting M13*. Al unir calcio, la calmodulina modificada GCaMP6 cambia su estructura y permite a la proteína cpGFP ser excitada y emitir fluorescencia (451). 48 horas después de la transfección las células se ajustaron a 4 mg/mL de proteína mediante un ensayo de Bradford (Bio-Rad) utilizando albúmina de suero bovino como estándar. La determinación de la movilización de calcio intracelular se realizó empleando un EnSpire Multimode Plate Reader (Perkin-Elmer). Los datos se expresan como la señal fluorescente emitida por la calmodulina modificada GCaMP6 menos la señal fluorescente emitida por las células en reposo (basal).



RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Regulación de la señalización endocannabinoide mediada por heterómeros de receptores en microglía activada. Papel y relevancia de los receptores CB₁ y CB₂ en la enfermedad de Alzheimer y en la disquinesia inducida por levodopa

El sistema endocannabinoide está constituido por tres tipos de moléculas: Lípidos, principalmente anandamida y 2-AG, enzimas que sintetizan y degradan estos compuestos, y dos receptores, CB₁ y CB₂ (452). Los receptores de cannabinoides pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína heterotrimérica G. Ambos receptores, CB₁ y CB₂, se encuentran acoplados a proteína Gα_i, es decir, su activación conduce a la inhibición de la AC y a la disminución de los niveles intracelulares de cAMP. Aunque el receptor CB₁ se localiza principalmente en neuronas del SNC (3), también ha sido reportada su expresión en glía (453). De hecho, el receptor CB₁ se considera el GPCR más abundante del SNC.

La heteromerización de GPCR es un fenómeno altamente aceptado cuya relevancia fisiológica requiere más trabajo experimental. Callén y colaboradores (233) fueron los primeros en demostrar que los receptores CB₁ y CB₂ pueden formar heterómeros funcionales en el cerebro. Posteriormente, el globo pálido de primates no humanos se identificó como una región del SNC con abundancia de expresión del heterómero CB₁R/CB₂R (454). A nivel funcional, además de un antagonismo cruzado, característica que comparten muchos otros heterómeros de GPCR descritos hasta el momento, los autores reportaron un *cross-talk* negativo entre ambos receptores cannabinoides en el heterómero. Esto significa que la activación de un receptor bloquea la respuesta del receptor asociado en el heterómero. Mediante el uso de una línea celular neuronal, la coactivación con agonistas específicos de los receptores CB₁ y CB₂ resultó en un *cross-talk* negativo en la fosforilación de Akt y en la proliferación de neuritas (233). Asumiendo un comportamiento similar en las células gliales, los endocannabinoides, en ausencia de estímulos nocivos, servirían para prevenir la activación glial.

El sistema endocannabinoide sufre cambios profundos en las enfermedades neurodegenerativas, especialmente aquellas con un componente inflamatorio. No sólo se ve afectada la expresión de los receptores CB₁ y CB₂, sino también la de los endocannabinoides, los cuales sufren cambios a lo largo del tiempo en trastornos neurodegenerativos y neuroinflamatorios. La respuesta fisiológica mediada por el sistema endocannabinoide es contrarrestar la inflamación (455). La activación del receptor CB₂ también se considera que tiene un efecto antiinflamatorio, aunque puede potenciar o incluso desencadenar daño tisular en enfermedades del SNC (456).

4.1.1. Materiales y métodos ¹

4.1.1.1. Reactivos

El LPS y el interferón-γ (IFN-γ) se adquirieron de Sigma-Aldrich y el 2 - Araquidonilglicerol, anandamida, ACEA, rimonabant, JWH133, CP55940 y AM630 de Tocris Bioscience (Bristol, R.U.). El LPI se adquirió de Merck/Millipore (Billerica, Massachusetts, E.E.U.U.).

4.1.1.2. Vectores de expresión

Se utilizó cDNA humano de los receptores CB₁, CB₂ y D₁. Estos receptores se amplificaron mediante PCR sin su codón de parada. Posteriormente se subclonaron *in-frame* en un vector que contiene la secuencia de la *Renilla luciferase*, Rluc (pRluc-N1, Perkin-Elmer®, Wellesley, MA, E.E.U.U.), mediante el uso de cebadores sentido y antisentido que contienen sitios de restricción para los enzimas HindIII y BamHI, o subclonados *in-frame* en un vector que contiene la secuencia de la proteína fluorescente amarilla, EYFP (Clontech laboratories inc., Heidelberg, Alemania) o de la proteína fluorescente verde, GFP² (Clontech laboratories inc., Heidelberg, Alemania) utilizando cebadores específicos sentido y antisentido que contienen sitios de restricción para BamHI y KpnI. De esta forma se obtuvieron las siguientes proteínas de fusión: CB₁R-Rluc, CB₂R-Rluc, CB₁R-YFP, D₁R-GFP² y CB₂R-GFP².

4.1.1.3. Generación del modelo de la enfermedad de *Parkinson* (PD), tratamiento con levodopa y evaluación de la discinesia

La generación del modelo de enfermedad de Parkinson se llevó a cabo tal y como se describe en el punto 3.4 del apartado de materiales y métodos generales.

4.1.1.4. Ratón transgénico APP modelo de la enfermedad de Alzheimer (AD)

Los ratones transgénicos APP_{Sw, Ind} (línea J9, fondo C57BL / 6) que expresan APP695 humana que alberga el FAD-linked, que contiene la variante K670 N/M671 L e Indiana (V717 F) en el promotor de PDGFβ, se obtuvieron mediante el cruce de ratones APP_{Sw, Ind} y de ratones no transgénicos (WT) (443).

4.1.1.5. Producción de oligómeros de Aβ

La preparación y prueba de oligómeros de Aβ se realizó como está descrito en el trabajo realizado por Röncke y colaboradores (444). En resumen, el péptido Aβ₁₋₄₂ liofilizado se disolvió en 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP, Sigma-Aldrich) a 0,5 mg/mL. La solución se repartió en alícuotas. Tras la evaporación del HFIP, el péptido se guardó a -80 °C. 24 horas antes de su uso, el péptido se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich), se sonicó, y se redisolvió en medio F12 (Gibco) a una concentración de 5 μM. Finalmente, se mantuvo a 4 °C durante 24 horas hasta su oligomerización (445). En cada experimento se utilizaron preparaciones de péptido Aβ₁₋₄₂ frescas. La calidad de las preparaciones se verificó mediante electroforesis en gel SDS-PAGE (gel de Tricina al 10%) y *western-blot* empleando anticuerpos específicos frente a la región amino terminal del péptido Aβ-82E1 (1:1000, IBL, Cat. 10323) (ver (444)).

4.1.1.6. Cultivo celular y transfección transitoria

Las células N9 microgliales se cultivaron en medio RPMI (Gibco®) suplementado con L-Glutamina 2 mM, ampicilina 50μg/mL, estreptomicina 50μg/mL y 5% de suero fetal

bovino (FBS) con el sistema del complemento inactivado por calor. Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO₂. En caso necesario, las células se transfectaron transitoriamente empleando el método de polietilenimina, PEI (448). Para preparar los cultivos primarios de microglía de estriado, se retiró el cerebro de ratones C57BL /6 de 2-4 días de edad. Las células microgliales se aislaron siguiendo protocolos descritos con anterioridad (449) y se cultivaron en placas de 6 pocillos (Corning®) en medio DMEM (Gibco®) suplementado con L-Glutamina 2 mM, ampicilina 50µg/mL, estreptomycin 50µg/mL y 5% de suero fetal bovino (FBS) con el sistema del complemento inactivado por calor. Para llevar a cabo la RT-PCR los cultivos gliales se trataron con tripsina diluida siguiendo el procedimiento descrito en Saura et al., 2003 (450) para obtener una pureza superior al 98% de células gliales. Para otros ensayos las células se sembraron en placas de 6 pocillos (Corning®) o en placas de 96 pocillos con fondo de poli-D-lisina (Corning®) con una densidad de 50.000 células/pocillo. Los cultivos primarios de neuronas del núcleo hipotalámico se obtuvieron de fetos de rata *Sprague-Dawley* (día embrionario 19). Las células se aislaron como se describe en Hradsky et al., 2013 (447). Las células se mantuvieron en medio neurobasal suplementado con L – Glutamina 2 mM, ampicilina 50µg/mL, estreptomycin 50µg/mL y 2% de suplemento de B27 durante 12 días hasta su uso en el experimento correspondiente. De nuevo todos los productos que se utilizaron son de la marca Gibco® by life technologies™.

4.1.1.7. Viabilidad celular

El porcentaje de supervivencia celular se calculó contando células vivas y muertas con un contador de células automatizado Countless II FL automated cell counter (Thermo Fisher Scientific-Life Technologies) tras diluir las células con azul de tripán (1:1 v/v).

4.1.1.8. Ensayo de BRET

Para llevar a cabo el ensayo de BRET las células N9 se transfectaron transitoriamente con una cantidad constante de cDNA que codifica para CB₁R-Rluc y con cantidades crecientes de cDNA que codifica para CB₂R-GFP² o D₁R-GFP². 48 horas después de la transfección las células se ajustaron a 2 mg/mL de proteína mediante un ensayo de Bradford (Bio-Rad) utilizando albúmina de suero bovino como patrón. Para cuantificar la expresión de GFP², la fluorescencia se leyó en un FluoStar Optima Fluorimeter (BMG, Labtechnologies, Offenburg, Alemania) equipado con una lámpara de Xenón de alta energía y utilizando un filtro de excitación con un ancho de banda de 10 nm, excitando a 400 nm. Para las mediciones de BRET se recogieron lecturas 30 segundos después de la adición de 5 µl de DeepBlueC (Molecular Probes, Eugene, OR) utilizando un MITHRAS LB 940 HTS III *multimode reader* (BERTHOLD Technologies) y recogiendo la señal emitida a 510 nm. Para cuantificar la luminiscencia del receptor fusionado con Rluc, se llevó a cabo una lectura a los 10 minutos tras la adición de la coelenterazina 5 µM. El BRET se expresó como mili unidades de BRET (mBU, (Emisión₅₃₀/Emisión₄₈₅) X 1000).

4.1.1.9. Procedimientos de inmunotinción

Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos y se lavaron con PBS (NaCl 138 mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM, K₂ HPO₄ 1,5 mM) suplementado con glicina 20 mM para inactivar los grupos aldehído antes de la permeabilización con PBS-glicina y detergente Tritón X-100 al 0,2 % durante 5 minutos. Las células N9 se trataron durante 1 hora con PBS-glicina con albúmina de suero bovino (BSA) al 1% durante una hora y se marcaron con anti-iba1 *rabbit* (1/100; Sigma-Aldrich), anti-CB₁R *goat* (1/100, Santa Cruz Technologies) y/o anti-CB₂R *rabbit* (1/100, Cayman Chemical, Ann Arbor, Míchigan, E.E.U.U.), y anti-Rluc *mouse* (Chemicon-Millipore corp) durante una hora más. Posteriormente, las muestras se trataron con anticuerpos secundarios Alexa flúor 488-conjugado frente a cabra (1/200, Invitrogen (verde)) y anticuerpo frente a ratón o conejo conjugado con Cy3 (1/200, Jackson ImmunoResearch, Baltimore, E.E.U.U. (rojo)) durante una última hora. Las células gliales activadas se detectaron mediante el uso de anticuerpos primarios de Abcam (Anti-MHC Clase II [MRC OX-6] Ab23990 (1/100)) en muestras de ratas, y Ab180779 (1/100) en muestras de ratones) y anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos. Posteriormente, las muestras se lavaron varias veces y se montaron con Mowiol al 30% (Calbiochem). Las muestras se observaron en un microscopio confocal Leica SP2 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Escala: 5 µm. La fluorescencia se cuantificó con el software Fiji-Image J.

4.1.1.10. Determinación de cAMP intracelular

Dos horas antes de iniciar el experimento, se cambió el medio de las células N9 o microgliales por medio DMEM (Gibco®) sin suplementar. Tras esto, las células se levantaron y se resuspendieron en medio de cultivo DMEM que contiene HEPES 5mM, Zardaverina 32 µM y BSA 0,1%, PH 7,4. Las células se colocaron en microplacas de 384 pocillos (2.500 células/pocillo), se pretrataron con los correspondientes antagonistas/vehículo durante 15 minutos, y se estimularon con los agonistas selectivos durante 15 minutos más antes de añadir Forskolina 5 µM o vehículo durante otros 15 minutos. Las lecturas se realizaron 1 hora después de la incubación con anticuerpos específicos para cAMP a 25 °C. Las medidas de la transferencia homogénea de energía fluorescente resuelta en el tiempo (HTRF) se realizaron con un kit LANCE® *Ultra cAMP* (Perkin-Elmer®). La fluorescencia se analizó a 665 nm con un lector de microplacas PHERAstar Flagship equipado con un módulo óptico para HTRF (BMG Lab Technologies, Offenburg, Alemania).

4.1.1.11. Ensayo de fosforilación de ERK

Para determinar la fosforilación de ERK1/2 se sembraron microplacas transparentes de 96 pocillos Deltalab a una concentración de 40.000 células/pocillo que fueron incubadas durante 24 horas. Entre 2 y 4 horas antes de realizar el experimento, el medio de cultivo empleado se reemplazó por medio DMEM sin suplementar. Seguidamente, las células se pretrataron a 25 °C durante 15 minutos con vehículo o antagonistas, y posteriormente se llevó a cabo un tratamiento con vehículo o con los agonistas específicos durante 10 minutos. Las células se lavaron con PBS frío antes de añadir

tampón de lisis (tratamiento de 20 minutos). 10 µl de cada sobrenadante resultado de la lisis se cargaron en una placa ProxiPlate de 384 pocillos. La fosforilación de ERK1/2 se determinó utilizando el kit AlphaScreen SureFire (Perkin Elmer) siguiendo las instrucciones del proveedor en un EnSpire Multimode Plate Reader (Perkin-Elmer).

4.1.1.12. Ensayo de distribución dinámica de masa (DMR)

Para el ensayo de Distribución Dinámica de Masa (DMR) con células N9 o microglía, las células se sembraron en placas de 384 pocillos con microsensores (Perkin-Elmer) a una concentración de 10.000 células por pocillo y se mantuvieron en incubación a 37 °C y una atmósfera del 5% de CO₂. Antes del ensayo, las células se lavaron dos veces con HBSS suplementado con HEPES 20 mM, BSA 0,1 %, DMSO 0,1 %, pH 7,15, y a continuación se incubaron durante 2 horas con este mismo tampón (24 °C, 30 mL/pocillo). Posteriormente, la placa se escaneó y se registró la señal basal durante 10 minutos antes de añadir 10 µL de los antagonistas específicos durante 30 minutos, seguido de la adición de 10 µL de los agonistas específicos. Todos los compuestos del ensayo se disolvieron en el tampón previamente descrito. La DMR se registró durante al menos 5.000 segundos en un EnSpire Multimode Plate Reader (Perkin-Elmer). Los resultados se analizaron usando el *software* EnSpire Workstation v 4.10.

4.1.1.13. Producción de óxido nítrico (NO)

Para la detección de NO, se colocaron 60.0000 células/pocillo en placas transparentes Deltalab de 96 pocillos y se incubaron durante 48 horas con diferentes concentraciones de LPS e IFN-γ o con vehículo. Una fracción de los sobrenadantes (50 µL) se recolectó y se analizó la producción de NO mediante el uso del reactivo de Griess (Promega). La absorbancia se midió a 540 nm usando un espectrofotómetro Multiskan Ascent (Thermo labsystems).

4.1.1.14. Ensayo de ligación *in situ* por proximidad

Las células N9 y los cultivos primarios microgliales se cultivaron sobre cubres de vidrio y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos, se lavaron con PBS-glicina 20 mM para inactivar los grupos aldehído y se permeabilizaron con PBS-glicina que contiene Tritón X-100 al 0,2% durante 5 minutos. Después las células se incubaron durante una hora a 37 °C con una solución de bloqueo. Las secciones congeladas de cerebro se descongelaron a 4 °C en tampón Tris-HCl 50 mM, y se permeabilizaron con TBS que contiene Tritón X-100 al 0,01% durante 10 min y se lavaron con TBS. Las muestras se trataron con anticuerpos primarios específicos contra los receptores CB₁ y CB₂ (*goat* anti-CB₁R 1/100; *rabbit* anti-CB₂R respectivamente, de Santa Cruz Technologies y Cayman Chemical) y se procesaron utilizando sondas de PLA que detectan anticuerpos de conejo y cabra (sonda Duolink II PLA anti-*Rabbit* plus y sonda Duolink II PLA anti-*Goat* minus). Los núcleos se marcaron con Hoechst (1/200; Sigma-Aldrich). Las muestras se montaron con Mowiol al 30% (Calbiochem). Finalmente, las muestras se observaron en un microscopio confocal Leica SP2 (Leica Microsystems)

equipado con un objetivo de inmersión en aceite 63X apocromático (N.A. 1.4) y líneas láser de 405 nm y 561 nm. En cada campo se tomaron imágenes en dos canales diferentes, uno para cada marcaje (azul para los núcleos, rojo para los heterómeros), siguiendo el eje Z, con una distancia entre imágenes de un micrómetro. El número de células que contienen uno o más puntos rojos frente al total de células (número de núcleos en azul) y la ratio (r , número de puntos rojos/célula que contiene puntos rojos) se determinaron mediante el software Duolink Image.

4.1.1.15. PCR en tiempo real

Se extrajo y se aisló el RNA total de cultivos de microglía tratados durante 48 horas con vehículo (medio de cultivo celular) o LPS con o sin IFN- γ mediante lisado de las células microgliales sembradas en *Flasks* de 75 cm² (Corning) con 1 mL de TriReagent (Sigma-Aldrich) y 100 mL de 1-bromo-3-cloropropano (BCP, Sigma-Aldrich). La fase acuosa que contenía el RNA total se recuperó después de centrifugar 15 min a 12.000 g y 4 °C, y se mezcló con un volumen igual de etanol frío al 70% y se cargó en una columna PureLink™ Micro Kit (Invitrogen). El RNA total se purificó después siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA total se cuantificó espectrofotométricamente utilizando un *Nano Drop* ND-1000 (Thermo Scientific) y su integridad y la calidad se evaluaron con el sistema Bioanalyzer 2100 (Agilent). El RNA total (1 μ g) se transcribió inversamente de forma aleatoria mediante cebado aleatorio utilizando la transcriptasa inversa M-MLV, la RNasa H *minus*, mutante puntual, siguiendo el protocolo de “Two-Step RT-PCR” proporcionado por Promega (Promega, Madison, WI, EE. UU.).

El cDNA monocatenario obtenido se usó en una PCR para CB₁R, CB₂R y GAPDH como control interno usando la *Taq* DNA polimerasa (Promega). Se emplearon dos cebadores de CB₁R de rata, un *forward*, 5'-CATCCAGTGTGGGAGAAT-3' y un cebador *reverse* 5'-TATGGTCCACATCAGGCAA-3'. Para amplificar CB₂R, se empleó como cebador *forward* 5'-CATCACTGCCTGGCTCACT-3' y como cebador *reverse* 5'-AGCATAGTCCTCGGTCCTCA-3'. Para amplificar GAPDH los cebadores que se utilizaron fueron 5'-CATCCTGCACCACCACTGCTTAG-3' (*forward*) y 5'-GCCTGCTTCACCACCTTCTTGATG-3' (*reverse*). El RNA sin transcripciones inversas no produjo amplicones, lo que indica que no hubo contaminación con DNA genómico.

4.1.2. Resultados experimentales ¹

4.1.2.1. Identificación de complejos heteroméricos de los receptores CB₁ y CB₂ mediante BRET

La formación de heterómeros de los receptores CB₁ y CB₂ ya había sido demostrada con anterioridad en sistemas de expresión heterólogos y en algunos grupos de neuronas estriatales (233). El enfoque de este proyecto consiste en descubrir si la formación de heterómeros puede ocurrir en células microgliales en reposo y/o activadas. Por un lado, se realizó la transfección de células N9 con una concentración constante de cDNA (0,7 μ g) de CB₁R-Rluc y concentraciones crecientes de cDNA de CB₂R-GFP² que dio como resultado una fluorescencia en un rango entre las 1.000-12.000 unidades de fluorescencia. La funcionalidad de las proteínas de fusión fue comprobada previamente

(Figura 2A). En las células cotransfectadas se observó una curva de saturación de BRET ($BRET_{max}$ de 46 ± 2 mBU y $BRET_{50}$ de 4 ± 1), que indica la existencia de complejos heteroméricos entre los receptores cannabinoides CB_1 y CB_2 en células microgliales N9. Como control negativo, las células N9 se transfectaron con concentraciones constantes del cDNA de CB_1R -Rluc y con concentraciones crecientes de cDNA de D_1 -GFP² que dieron como resultado una fluorescencia en un rango entre las 1.000 y las 15.000 unidades de fluorescencia. Se observó una señal lineal que confirmó la ausencia de interacción específica entre los receptores CB_1 y D_1 (Figura 1A).

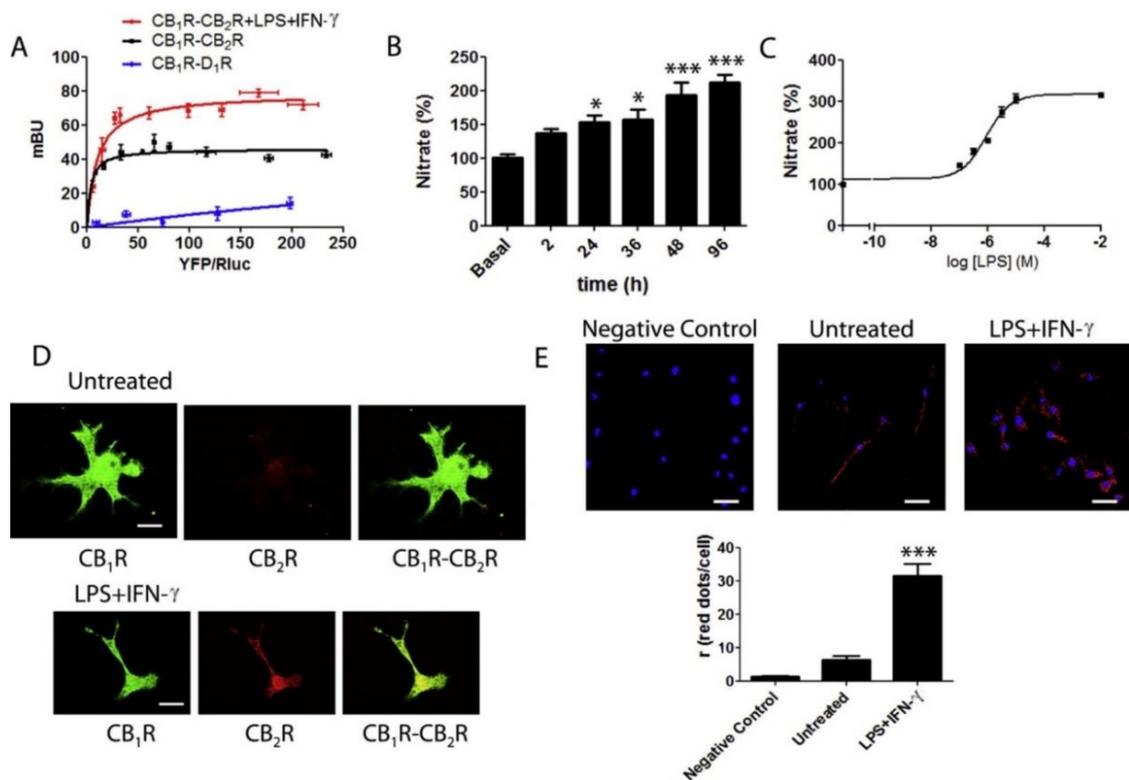


Figura 1. Heteromerización de los receptores CB_1 y CB_2 en células N9 microgliales en reposo y activadas. A: Los ensayos de BRET se llevaron a cabo en células N9 transfectadas con una cantidad constante de cDNA para CB_1R -Rluc ($0,7 \mu\text{g}$) y cantidades crecientes de cDNA para CB_2R -GFP² ($0,2$ - $1 \mu\text{g}$) y tratadas (línea roja) o no (línea negra) con $1 \mu\text{M}$ de LPS y 200 U/mL de IFN- γ (tratamiento de 48 horas). Como control negativo se transfectaron células N9 con una cantidad constante de cDNA para CB_1R -Rluc ($0,7 \mu\text{g}$) y cantidades crecientes de cDNA de D_1 -GFP² ($0,3$ - $1,5 \mu\text{g}$). Los valores son la media \pm S.E.M. de 8 experimentos diferentes. B y C: Las células N9 se trataron a diferentes tiempos (2 , 24 , 36 , 48 y 96 horas) con LPS $1 \mu\text{M}$ y 200 U/mL de IFN- γ (B) o durante 48 horas con diferentes concentraciones de LPS en presencia de 200 U/mL de IFN- γ (C). Posteriormente se midió la producción de óxido nítrico (NO). Los valores son la media \pm S.E.M. de 6 experimentos diferentes. Para el análisis estadístico se empleó un *one-way* ANOVA y un análisis *post hoc* de comparación múltiple de Bonferroni (* $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ versus condiciones basales). D: Se llevó a cabo una inmunocitoquímica en células N9 que sobreexpresan CB_1R -YFP, que ha sido detectada por su propia fluorescencia verde, y CB_2R -Rluc, que ha sido detectada con un anticuerpo específico de ratón anti-Rluc (rojo). La colocalización se muestra en amarillo. Barra de escala: $5 \mu\text{M}$. La fluorescencia se cuantificó con el software Fiji-Image J. E: Se realizó un ensayo de ligación *in situ* por proximidad (PLA) en células N9 tal y como se describe en el apartado de métodos, mediante el uso de anticuerpos específicos contra los receptores CB_1 y CB_2 . Los núcleos se tiñeron con Hoechst (azul) y los heterómeros se distinguen como puntos rojos. En el eje Y se muestra el número de puntos por células que contienen puntos. Las imágenes mostradas corresponden a *stacks* de 4 planos secuenciales. Los valores son la media \pm S.E.M. de 5 experimentos diferentes. El análisis estadístico consiste en un *one-way* ANOVA y un análisis *post hoc* de comparación múltiple de Bonferroni (***) $p < 0,001$ versus control). Barra de escala: $15 \mu\text{m}$.

Por otra parte, también se analizó la caracterización funcional del heterómero CB₁R/CB₂R en esta línea celular de microglía. En primer lugar, se llevó a cabo un ensayo dosis/respuesta y tiempo/respuesta de LPS en células N9 para poder determinar el mejor tratamiento y el mejor tiempo para inducir un proceso de neuroinflamación. La respuesta a lo largo del tiempo se analizó en un rango de tiempo entre 2 y 36 horas, y las concentraciones en el ensayo dosis/respuesta se encontraron en un rango de entre 0,1-5 μ M de LPS y de 200 U/mL de Interferón- γ . Se midió la producción de NO como marcador de la activación microglial. Los resultados en la figura 1B y 1C permitieron seleccionar la concentración de LPS 1 μ M y el tiempo de 48 horas para realizar los ensayos posteriores. Las células N9 que coexpresaban cantidades similares de CB₁R-Rluc y CB₂R-GFP² con respecto al control se trataron durante 48 horas con LPS 1 μ M y 200 U/mL de IFN- γ . La curva de saturación obtenida fue mayor que la de las células en reposo (BRET_{max} de 78 ± 3 mBU y BRET₅₀ de 10 ± 2) (Figura 1A). Estos resultados indican que en condiciones similares a la neuroinflamación se potencia la formación de heterómeros entre CB₁R y CB₂R, bien aumentando el número de heterómeros o reorganizando la estructura cuaternaria del heterómero (mejorando la estabilización del complejo CB₁R/CB₂R).

4.1.2.2. Identificación de los complejos heteroméricos CB₁R/CB₂R mediante inmunocitoquímica

Para evaluar la expresión endógena de los receptores cannabinoides en las células N9, se realizaron ensayos de inmunocitoquímica, empleando anticuerpos específicos contra los receptores CB₁ y CB₂, y se detectó la fluorescencia mediante microscopía confocal. La expresión del receptor CB₁ resultó ser relativamente elevada, mientras que el receptor CB₂ mostró una baja expresión (520 ± 30 y $150 \pm 20\%$ de incremento sobre basal, respectivamente). Sin embargo, cuando las células se trataron durante 48 horas con LPS 1 μ M y con IFN- γ 200 U/mL, la expresión de CB₁R resultó ser similar a la de las células en reposo, mientras que la expresión de CB₂R mostró un aumento muy marcado (580 ± 40 y $290 \pm 30\%$ de aumento sobre basal, respectivamente) (Figura 1D).

Los ensayos de ligación por proximidad (PLA) se utilizaron como técnica complementaria capaz de detectar interacciones proteína-proteína tanto en sistemas heterólogos como nativos. Los resultados de la PLA para detectar complejos CB₁R/CB₂R mostraron que el tratamiento con LPS e IFN- γ en células N9 produce un aumento notable en el número de puntos rojos, lo que se debe a un incremento en la proximidad entre ambos receptores (Figura 1E). El control negativo, donde falta el anticuerpo primario anti-CB₁R, mostró una cantidad despreciable de puntos rojos en todos los campos observados. La diferencia en el porcentaje de células que contienen puntos y en el número de puntos rojos por célula en las células N9 activadas resultó ser estadísticamente significativa en comparación con las células N9 en reposo. En resumen, en los resultados del BRET, la inmunocitoquímica y el análisis de PLA, se puede concluir que la activación de las células N9 provoca un aumento significativo de la expresión del receptor CB₂ y de la cantidad de heterómeros de receptores CB₁/CB₂.

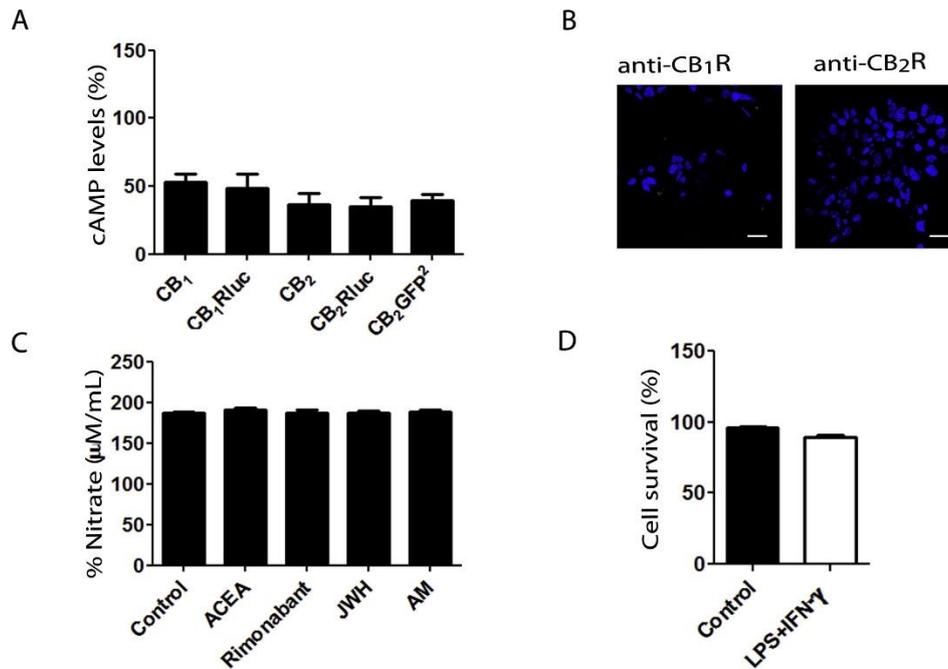


Figura 2. Controles de la funcionalidad de las proteínas de fusión, de la especificidad del anticuerpo y de la muerte celular en microglía cultivada. A: se transfectaron células N9 con los cDNA que codifican para CB₁R, CB₁R-Rluc, CB₂R, CB₂R-Rluc o CB₂R-GFP² y se estimularon con los agonistas selectivos del receptor CB₁ o CB₂. Las bajadas de los niveles de cAMP inducidos por forskolina se determinaron como se describe en los métodos. Los valores son la media \pm SEM de 5 experimentos diferentes. El análisis estadístico consiste en un *one-way* ANOVA y un análisis *post hoc* de comparación múltiple de Bonferroni (* $p < 0,05$, versus los receptores sin fusionar). B: la especificidad de los anticuerpos anti-receptor cannabinoide ha sido reportada en otros trabajos (233); se realizaron ensayos de inmunocitoquímica adicionales en células HEK-293T sin transfectar y tratadas con los anticuerpos específicos (anti-CB₁R (verde) (1/100), anti- CB₂R (rojo) (1/100)). Barra de escala: 5 μ m. C: se trataron los cultivos primarios de microglía de estriado durante 48 horas con LPS 1 μ M y 200 U/mL de IFN- γ . Tras esto se adicionaron durante 30 minutos los agonistas ACEA (200 nM) o JWH133 (100 nM), o los antagonistas rimonabant (1 μ M) o AM630 (1 μ M) antes de la determinación de la producción de NO. Los valores son la media \pm S.E.M. de 5 experimentos diferentes. El análisis estadístico consiste en un *one-way* ANOVA y un análisis *post hoc* de comparación múltiple de Bonferroni. D: se estimularon los cultivos primarios de microglía de estriado con LPS 1 μ M y INF- γ 200 U/mL (barra blanca) o vehículo (barra negra) durante 48 horas. Tras esto se cuantificó la supervivencia/muerte celular. Los porcentajes son la media \pm S.E.M. de 5 experimentos diferentes.

4.1.2.3. Expresión de los transcritos de mRNA de los receptores cannabinoide

Con el objetivo de trasladar los procedimientos experimentales a un modelo más fisiológico se aislaron cultivos primarios de microglía de estriado de ratón. En primer lugar, se llevó a cabo una RT-PCR para determinar la expresión relativa de los transcritos de CB₁R y CB₂R en presencia de LPS, LPS e IFN- γ o vehículo en ratones *wild-type*. Se observó que la expresión del mRNA de CB₁R se duplica al tratar estos cultivos con LPS o con la combinación de LPS e IFN- γ (Figura 3^a), mientras que la expresión del mRNA de CB₂R aumentó 12 veces en presencia de LPS y 21 veces en presencia de LPS e IFN- γ frente a las células tratadas únicamente con vehículo (Figura 3B).

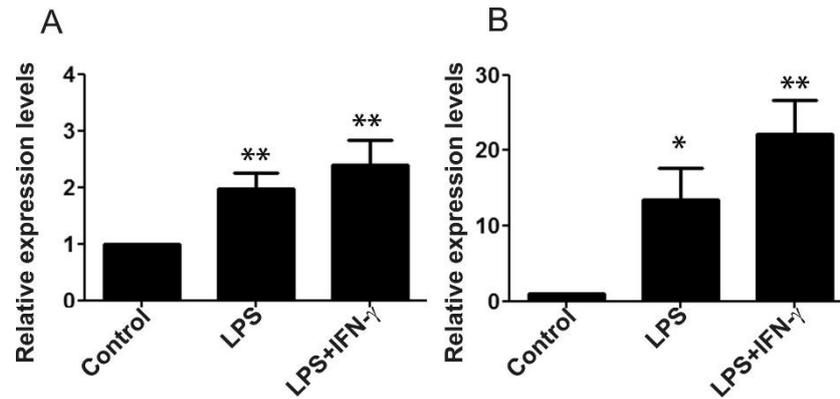


Figura 3. Expresión de los transcritos de mRNA de los receptores cannabinoides en cultivos primarios de microglía tratados con LPS o LPS más IFN- γ . Paneles A y B: la expresión relativa de CB₁R (A) o CB₂R (B) se determinó mediante RT-PCR usando cultivos primarios de microglía de ratones tratados con LPS o LPS más IFN- γ . Los valores son la media \pm S.E.M. de 8 experimentos diferentes. En todos los casos, se utilizó como análisis estadístico un estudio de *one-way* ANOVA y un análisis *post hoc* de comparación múltiple de Bonferroni (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ versus control).

4.1.2.4. Producción de óxido nítrico e identificación de complejos por inmunocitoquímica

Los cultivos primarios de microglía se trataron durante 48 horas con LPS 1 μ M e IFN- γ 200 U/mL y se evaluó la producción de NO para confirmar la activación de estas células. La producción de NO resultó ser significativamente superior en las células activadas que en las células inactivas (Figura 4^a). Sin embargo, el tratamiento previo con agonistas específicos como ACEA (200nM) o JWH133 (100 nM), o el tratamiento con los antagonistas rimonabant (1 μ M) o AM630 (1 μ M) no provocó cambios a corto plazo en la producción de NO en la microglía tratada durante 48 horas con LPS 1 μ M e IFN- γ 200 U/mL (Figura 2C). La inmunodetección con el anticuerpo anti-Iba 1 contra la molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1 (Iba 1) mostró como las células microgliales sin tratar con LPS o IFN- γ se extendieron normalmente en el cultivo, mientras que el tratamiento con ambos compuestos provocó una agrupación característica de las células microgliales (Figura 4B).

La evaluación de la muerte celular medida en cultivos microgliales tratados durante 48 horas fue moderada: 9% en células tratadas con LPS e IFN- γ frente a 4% en células sin tratar (Figura 2D). También se llevaron a cabo ensayos de inmunocitoquímica empleando anticuerpos específicos frente a los receptores CB₁ y CB₂ (la especificidad de los anticuerpos se verificó como se observa en la figura 2B). El resultado mostró un incremento marcado en el marcaje fluorescente del receptor CB₂ (de 280 ± 20 a $520 \pm 30\%$ sobre el basal) (Figura 4C), similar al resultado observado en las células N9. En el caso del receptor CB₁ el resultado no mostró un incremento en el marcaje fluorescente del receptor CB₁ (de 200 ± 10 a $270 \pm 30\%$ sobre basal) (Figura 4B). También se observó una marcada colocalización de los receptores CB₁ y CB₂ en estas condiciones. El ensayo de PLA mostró un aumento pronunciado en la cantidad de heterómeros por célula al tratar los cultivos primarios microgliales con LPS e IFN- γ (26 puntos/células que contienen puntos en presencia de LPS/IFN- γ frente a 2,3 en células sin activar) (Figura 4D). Estos resultados complementan los obtenidos utilizando células N9, mostrando un aumento marcado de los complejos CB₁R/CB₂R cuando se activa la microglía.

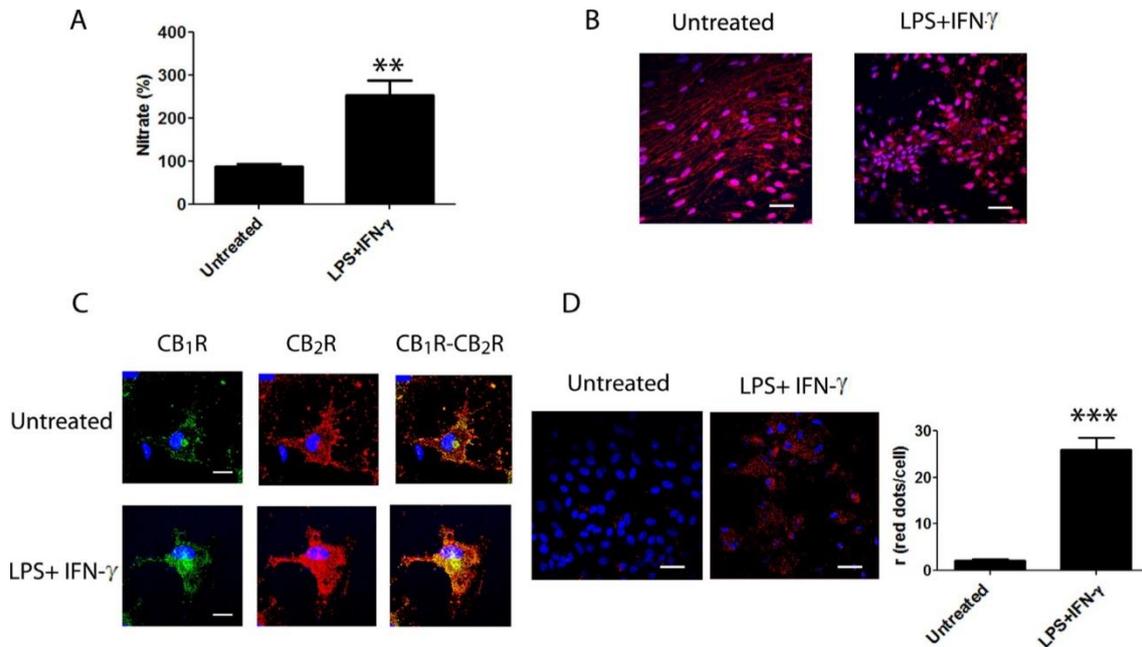


Figura 4. El tratamiento combinado de LPS e IFN- γ regula la expresión del receptor CB₂ en cultivos primarios de microglía de estriado de ratón. A: Se trataron cultivos primarios de células microgliales procedentes de cuerpo estriado con LPS 1 μ M e IFN- γ 200 U/mL durante 48 horas y se determinó la producción de nitrato. Los valores son la media \pm S.E.M. de 6 experimentos diferentes. Para el análisis estadístico se empleó un *one-way* ANOVA y un análisis *post hoc* de comparación múltiple de Bonferroni (** $p < 0.01$ versus control). B-C: Se realizaron ensayos de inmunocitoquímica en los cultivos primarios de microglía de cuerpo estriado tras ser incubados durante 48 con vehículo o con LPS 1 μ M e IFN- γ 200 U/mL. La tinción se llevó a cabo usando (B) anticuerpos frente al marcador microglial Iba 1 (Iba-1, 1/10) y con un anticuerpo secundario anti-conejo Cyn3 (Jackson ImmunoResearch (rojo)) (1/200) o usando anticuerpos específicos (C) frente a CB₁R (verde) (1/100) o CB₂R (rojo) (1/100). La colocalización en la imagen C se muestra en amarillo. Se muestran imágenes representativas de microscopía confocal. Barras de escala: 5 μ m. D: Se realizó un ensayo de ligación *in situ* por proximidad (PLA) tal y como se describe en el apartado de métodos en células microgliales de cuerpo estriado incubadas durante 48 horas en ausencia o en presencia de LPS 1 μ M e IFN- γ 200 U/mL, usando anticuerpos primarios frente a CB₁R y CB₂R. Los núcleos se tiñeron con Hoechst (azul) y los heterómeros se distinguen como puntos rojos. Las imágenes mostradas corresponden a *stacks* de 4 planos secuenciales. Barra de escala: 30 μ m. Los valores son la media \pm S.E.M. de 5 experimentos diferentes. El análisis estadístico consiste en un *one-way* ANOVA y un análisis *post hoc* de comparación múltiple de Bonferroni (***) $p < 0.001$ versus control).

4.1.2.5. Modulación por agonistas y antagonistas de cAMP, MAPK y DMR en microglía en reposo

Hoy en día es aceptado que la señalización de un GPCR específico puede cambiar en un contexto heteromérico. Para determinar las propiedades de los heterómeros de receptores CB₁ y CB₂ se midieron los cambios en los niveles de cAMP intracelulares inducidos por el tratamiento previo con forskolina, la fosforilación de ERK1/2 y la distribución dinámica de masa tras la activación de los receptores (DMR). La distribución dinámica es una técnica que se utiliza en investigación de GPCR y que mide el reordenamiento de los componentes celulares, que como consecuencia da lugar a una redistribución de la masa celular, en un proceso mediado por la actividad de la proteína G (457). Al tratar las células N9 con ACEA (200 nM), el agonista selectivo de CB₁R, se observó una disminución significativa de los niveles de cAMP inducidos por forskolina (0,5 μ M), lo que confirmó el acoplamiento a proteína Gi del receptor CB₁. El tratamiento

con el agonista selectivo de CB₂R, JWH133 (100 nM), no provocó efectos significativos en los niveles de cAMP inducidos por forskolina. Sin embargo, al tratar las células N9 con ACEA y JWH133 no se observó ningún efecto, lo que indica que incluso a niveles bajos de expresión, la activación del receptor CB₂ bloquea la actividad del receptor CB₁. El tratamiento con anandamida y 2-AG también mostró la capacidad de CB₂R de inhibir la funcionalidad del receptor CB₁ (Figura 5A). Al pretratar las células N9 con el antagonista selectivo de CB₁R, rimonabant (1 μM), no se observó únicamente el bloqueo del receptor CB₁, sino que también se bloqueó la actividad del receptor CB₂ inducida por su agonista selectivo. Además, el tratamiento con el antagonista selectivo de CB₂R, AM630 (1 μM), dio como resultado una reducción en la disminución de los niveles de cAMP provocada por la activación del receptor CB₁ (Figura 5A). Los resultados observados en la fosforilación de ERK1/2 y en la DMR fueron similares (Figura 5B-C). Estos resultados observados en los distintos ensayos sugieren que en las células microgliales N9 en reposo los receptores de cannabinoides presentan un efecto de *cross-talk* negativo y un *cross*-antagonismo parcial.

4.1.2.6. Modulación por agonistas y antagonistas de cAMP, MAPK y DMR en microglía activada

Células N9 fueron tratadas durante 48 horas con LPS e IFN-γ para determinar la funcionalidad de los receptores cannabinoides en microglía activada. El tratamiento con el agonista selectivo del receptor CB₁, ACEA, resultó similar en células tratadas y sin tratar, mientras que el tratamiento con el agonista selectivo de CB₂R, JWH133, provocó una disminución importante en los niveles de cAMP inducidos por forskolina cercana al 55% (Figura 5D). Teniendo en cuenta los resultados descritos anteriormente en los ensayos de inmunocitoquímica, parece que los receptores CB₂ tienen un papel funcional importante en condiciones que imitan la neuroinflamación. Sorprendentemente, el efecto en los niveles de cAMP inducidos por forskolina al tratar las células N9 simultáneamente con ACEA y JWH133 resultó aditivo. Es decir, en condiciones de neuroinflamación, el receptor CB₂ levanta el bloqueo ejercido sobre el receptor CB₁ para sumarse en la señalización. Por otro lado, el tratamiento con los endocannabinoides anandamida y 2-AG mostró un efecto de *cross-talk* positivo que contrasta con el resultado obtenido en las células en reposo (Figura 5D).

Al analizar el *cross*-antagonismo se observó que resulta más robusto en las células activadas en comparación con el estado basal. El pretratamiento con cualquiera de los dos antagonistas selectivos de los receptores CB₁ y CB₂ resultó en una supresión cruzada de la activación de los receptores CB₁ y CB₂ (Figura 5D). Los ensayos de DMR y fosforilación de MAPK llevados a cabo en células activadas con LPS e IFN-γ mostraron un incremento en la potencia del agonista selectivo de CB₂R, JWH133. El incremento con respecto al basal fue aproximadamente 5 veces superior en el ensayo de fosforilación de ERK1/2 y 2 veces superior en el ensayo de DMR (Figura 5E-F). El efecto aditivo en el tratamiento con ACEA y JWH133 también mostró un incremento en la potencia. Estos efectos diferenciales entre el estado de reposo (*cross-talk* negativo) y el activado (*cross-talk* positivo) de las células microgliales contrasta con el *cross*-antagonismo observado en todas las condiciones.

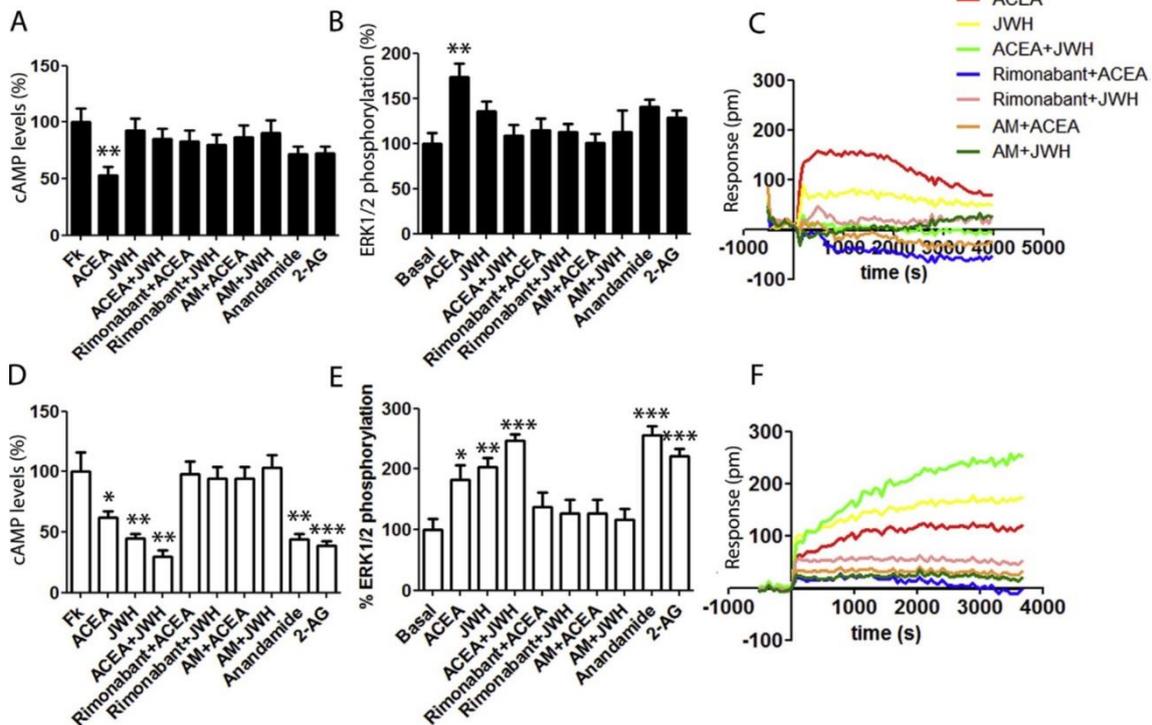


Figura 5. El tratamiento combinado con LPS e IFN- γ afecta la señalización del receptor cannabinoide en células N9. Las células N9 se incubaron durante 48 horas en ausencia (A, B, C) o en presencia de LPS 1 μ M e IFN- γ 200 U/mL (D, E, F). Tras las 48 horas de incubación, las células se trataron con los antagonistas selectivos de CB₁R y CB₂R (rimonabant 1 μ M para CB₁R y AM630 1 μ M para CB₂R) y posteriormente se trataron con los agonistas selectivos de CB₁R y CB₂R (ACEA 200 nM para CB₁R y JWH133 100 nM para CB₂R) por separado o en combinación, o con los endocannabinoides anandamida (200 nM) y 2-AG (200 nM). La disminución de los niveles de cAMP inducidos por forskolina se determinó 15 minutos después del tratamiento con forskolina 0,5 μ M (A, D). Los valores son la media \pm S.E.M. de 8 experimentos diferentes. La fosforilación de ERK1/2 se analizó empleando un kit AlphaScreen SureFire (Perkin Elmer). Los cambios en la DMR representan cambios en la longitud de onda de la luz reflejada (en picómetros) a lo largo del tiempo. Los valores son la media \pm S.E.M. de 8 experimentos diferentes. En los ensayos de acumulación de cAMP y en la señalización vía MAPK, se empleó un *one-way* ANOVA y un análisis *post hoc* de comparación múltiple de Bonferroni como análisis estadístico (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; *versus* el tratamiento únicamente con forskolina en el ensayo de acumulación de cAMP o *versus* células no tratadas en la determinación de la fosforilación de ERK1/2).

4.1.2.7. Modulación por agonistas y antagonistas de cAMP, MAPK y DMR en cultivos primarios de microglía de estriado

Se llevaron a cabo experimentos similares a los descritos en cultivos primarios de microglía de estriado de ratón. Los resultados del ensayo de determinación de niveles de cAMP (Figura 6A) y de fosforilación de ERK1/2 (Figura 6B) fueron similares a los obtenidos en los ensayos llevados a cabo en las células N9. La activación del receptor CB₂ en cultivos primarios tratados con LPS e IFN- γ resultó en una respuesta robusta, y el tratamiento simultáneo con los agonistas selectivos o con los antagonistas de los dos receptores mostró un efecto aditivo y un antagonismo cruzado respectivamente (Figura 6A-B, Figura 7A-B). El crecimiento de las células en presencia de agregados de β -amiloide, una de las características representativas de la enfermedad de Alzheimer (AD), dio lugar a unos resultados en los ensayos llevados a cabo similares a los obtenidos en las células activadas con LPS e IFN- γ (Figura 6A-B y Figura 7A-B).

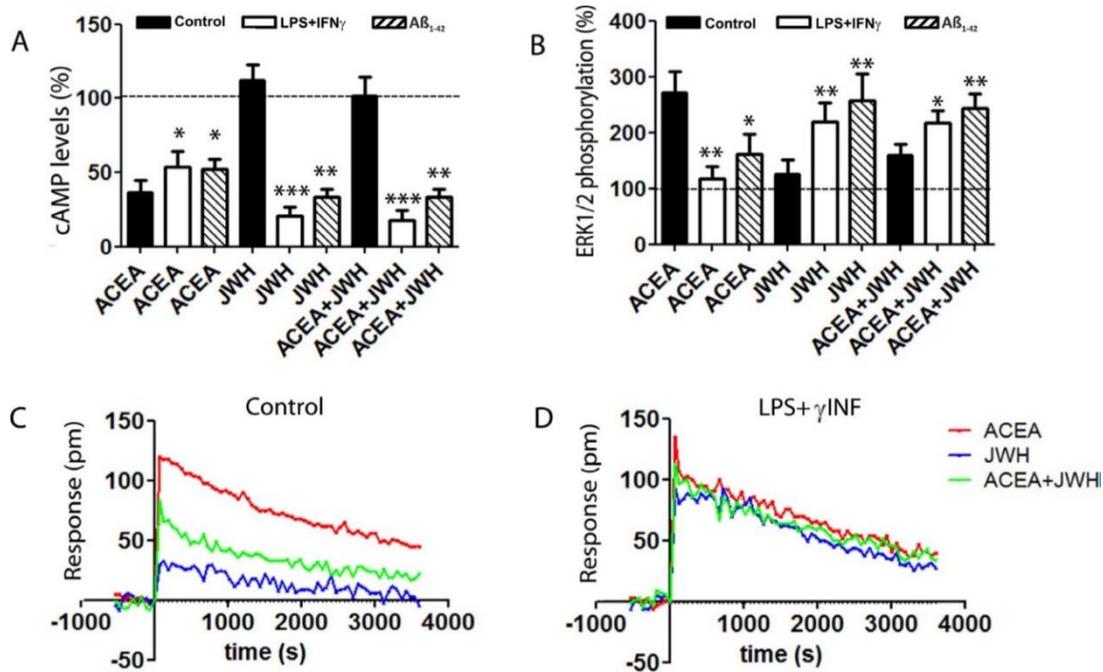


Figura 6. El tratamiento combinado de LPS e IFN- γ modifica la función de los receptores cannabinoides primarios de microglía de estriado de ratón. Los cultivos primarios de microglía se incubaron durante 48 horas en presencia (barras blancas) o ausencia (barras negras) de LPS 1 μ M e IFN- γ 200 U/mL, o en presencia de A β ₁₋₄₂ 500 nM (barras rayadas) y posteriormente han sido tratados con ACEA (200 nM), JWH133 (100 nM) o ambos. Los niveles de cAMP inducidos por forskolina (A) y la fosforilación de ERK 1/2 (B) se determinaron como se describe en los Métodos. Los valores son la media \pm S.E.M. de 7 experimentos diferentes. Para el análisis estadístico se llevó a cabo un *one-way* ANOVA y un análisis *post hoc* de comparación múltiple de Bonferroni (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, *versus* el tratamiento con forskolina en el ensayo de determinación de cAMP o *versus* células no tratadas en los ensayos de fosforilación de ERK1/2). C-D: los ensayos de DMR realizados en los cultivos primarios se incubaron durante 48 horas en ausencia (figura izquierda) o en presencia (figura derecha) de LPS 1 μ M e IFN- γ 200 U/mL, y posteriormente se trataron con ACEA (200 nM, rojo), JWH133 (100nM, azul) o ambos (verde). Los valores son la media \pm S.E.M. de 6 experimentos diferentes.

El ensayo de DMR en células en reposo y activadas arrojó también resultados similares a los obtenidos en los ensayos de determinación de cAMP y de fosforilación de ERK1/2. Sin embargo, existe una pequeña diferencia en los resultados. En las células activadas no se observa *cross-talk* positivo (Figura 6D). La señal de DMR resultó elevada para el tratamiento con ambos agonistas en los cultivos primarios, por lo que la DMR en el tratamiento simultáneo con ambos agonistas fue máxima, pudiendo ser esta la razón de que la tecnología de DMR no fuera capaz de detectar el *cross-talk* positivo detectado en los ensayos de determinación de cAMP y de fosforilación de ERK1/2. Cuando se analizaron cultivos primarios de microglía del hipocampo se observaron resultados similares (datos no presentados). Los resultados en células N9 y en cultivos primarios indican que la activación microglial conduce a un cambio cualitativo y cuantitativo muy marcado en los efectos mediados por los receptores de cannabinoides que, al menos en parte, parecen estar mediados por los heterómeros de receptores CB₁ y CB₂.

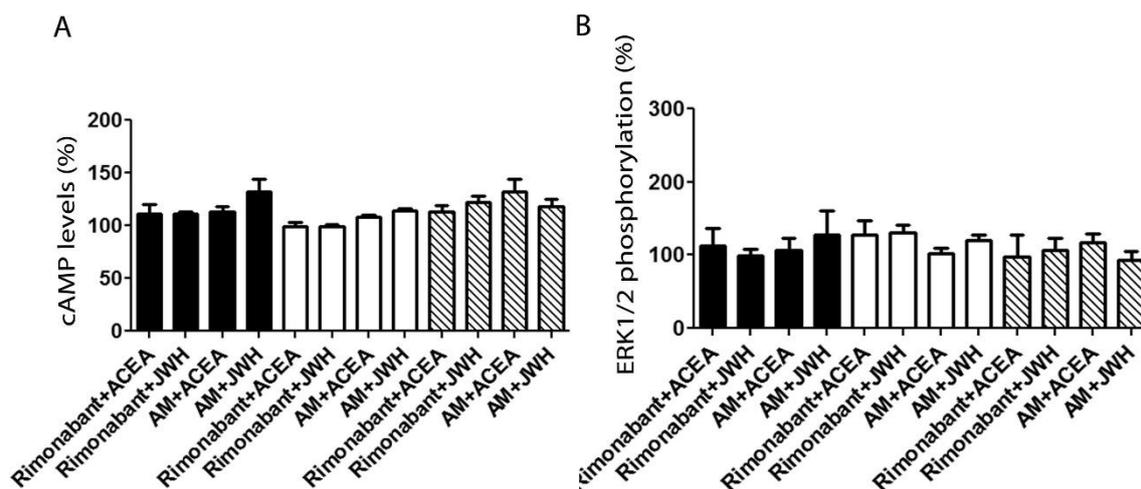


Figura 7. Cross-antagonismo entre CB₁R y CB₂R en cultivos primarios de microglía tratados con LPS e INF- γ . Los cultivos primarios de microglía se incubaron durante 48 h en presencia (barras blancas) o ausencia (barras negras) de LPS 1 μ M e INF- γ 200 U/mL o en presencia de A β ₁₋₄₂ (barras rayadas), y posteriormente se trataron con los antagonistas rimonabant (1 μ M) o AM630 (1 μ M) durante 15 minutos. Tras esto se trató durante 15 minutos con los agonistas específicos ACEA (200 nM), JWH133 (100 nM) o ambos. Los descensos en los niveles de cAMP inducidos por forskolina (A) y la fosforilación de ERK 1/2 (B) se determinó como se describe en los Métodos. Los valores son la media \pm S.E.M. de 6 experimentos diferentes. En todos los casos, se realizó un *one-way* ANOVA y un análisis *post hoc* de comparación múltiple de Bonferroni como análisis estadístico (no se encontraron diferencias estadísticamente significativas).

4.1.2.8. Expresión del heterómero CB₁R/CB₂R en cuerpo estriado de animales lesionados

El modelo de enfermedad de Parkinson en rata tratada con 6-hidroxi-DA se preparó por inyección unilateral en el hemisferio derecho, y cursa con activación microglial y neuroinflamación (458). Se utilizaron anticuerpos primarios específicos frente a los receptores CB₁ y CB₂, así como sondas de DNA unidas a anticuerpos secundarios de conejo y oveja para los ensayos de PLA. Empleando sondas (ver Métodos), la proximidad entre los dos receptores se detectó mediante microscopía confocal, y se observó como una señal punteada roja. En animales sin la enfermedad, se observó que el 8% de las células presentaban señales de PLA positivas con 2 clústeres rojos/célula (Figura 8A). En los animales lesionados, en el hemisferio intacto (izquierdo) se observó un 9,2 % de células marcadas con un valor ligeramente inferior a 2 puntos rojos/célula (Figura 8B). Por otro lado, en el hemisferio dañado (derecho) se observó un incremento en el porcentaje de células marcadas significativo (18,7%), con 2,4 puntos rojos/célula que tiene puntos. El resultado indica que los animales lesionados presentan un aumento significativo en el nivel de heterómeros de receptores CB₁/CB₂ en el cuerpo estriado. En secciones equivalentes, se probó la activación de la microglía con anticuerpos frente a un marcador de activación del MHC de clase II de rata. A diferencia de los animales control, existió un alto número de células activadas en ratas lesionadas y tratadas con levodopa (tanto discinéticas como no discinéticas (Figura 8A)). Sin embargo, las diferencias intergrupales en el número de células microgliales activadas en animales con lesión provocada por 6-hidroxi-DA no resultaron estadísticamente significativas (Figura 8A, gráfico a la derecha).

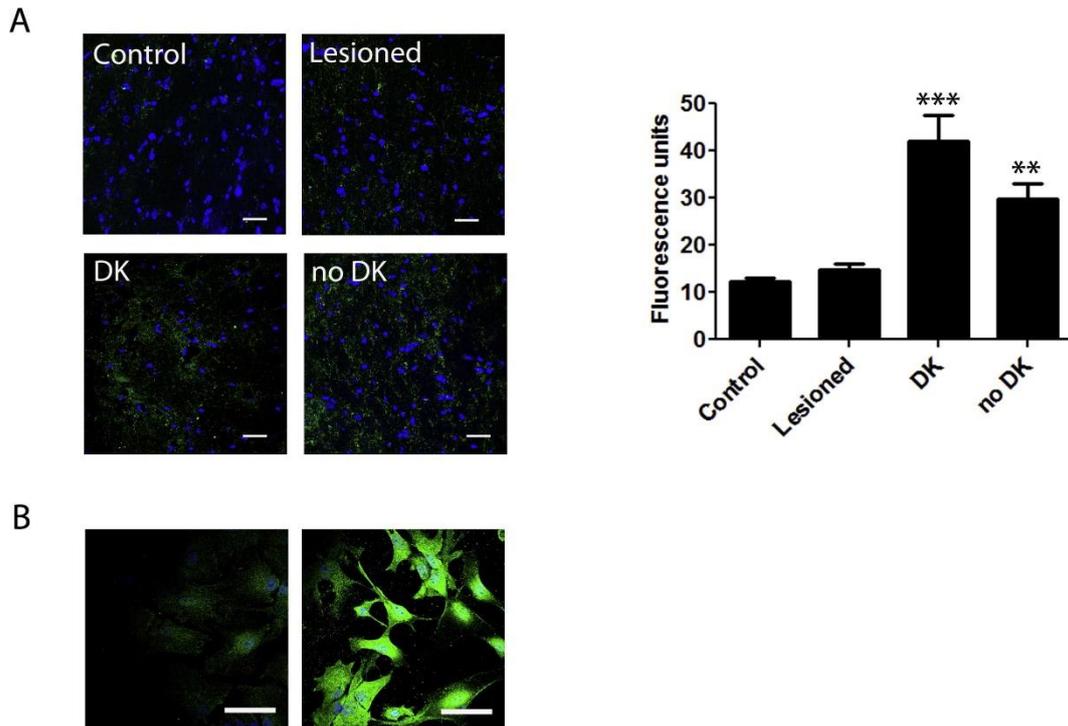


Figura 8. Detección de microglía activada en muestras de modelos animales. A: secciones hemisféricas del control, de ratas lesionadas (*Lesioned*) y de ratas lesionadas tratadas con levodopa que muestran discinesia (DK) o no (no DK) se tiñeron usando el anticuerpo anti-MHC de clase II Ab23990 [MRC OX-6], para detectar células de microglía activada en ratas. La inmunohistoquímica se realizó usando un anticuerpo secundario conjugado con Alexa Flúor. La fluorescencia se cuantificó empleando el software Fiji-Image J. Los valores son la media \pm S.E.M. de 6 experimentos diferentes. Se realizó un *one-way* ANOVA y un análisis *post hoc* de comparación múltiple de Bonferroni como análisis estadístico (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ *versus* animales control, no se observan diferencias significativas entre los animales DK y los no DK). B: se llevó a cabo una inmunocitoquímica en cultivos primarios de microglía de un control no transgénico de dos días y en muestras de ratones APP_{Sw, Ind} usando un anticuerpo específico (Ab180779) para detectar células de microglía de ratón activadas. Seguidamente, se utilizó un anticuerpo secundario conjugado con Alexa Flúor.

4.1.2.9. Expresión del heterómero de receptores CB₁/CB₂ en cuerpo estriado de animales discinéticos

En ratas con discinesia inducida por tratamiento crónico con levodopa, el porcentaje de células en el hemisferio lesionado que muestran puntos rojos es del 33,7% con un promedio de 4 puntos rojos/célula. En contraste, el tratamiento con levodopa en ratas que no presentan discinesia muestra unos resultados similares a los de los animales control o a los obtenidos en el hemisferio izquierdo de animales lesionados (8,7% y 1,3 puntos rojos/célula) (Figura 9B). Estos resultados indican que los animales discinéticos presentan un aumento importante en el número de complejos heteroméricos CB₁R/CB₂R.

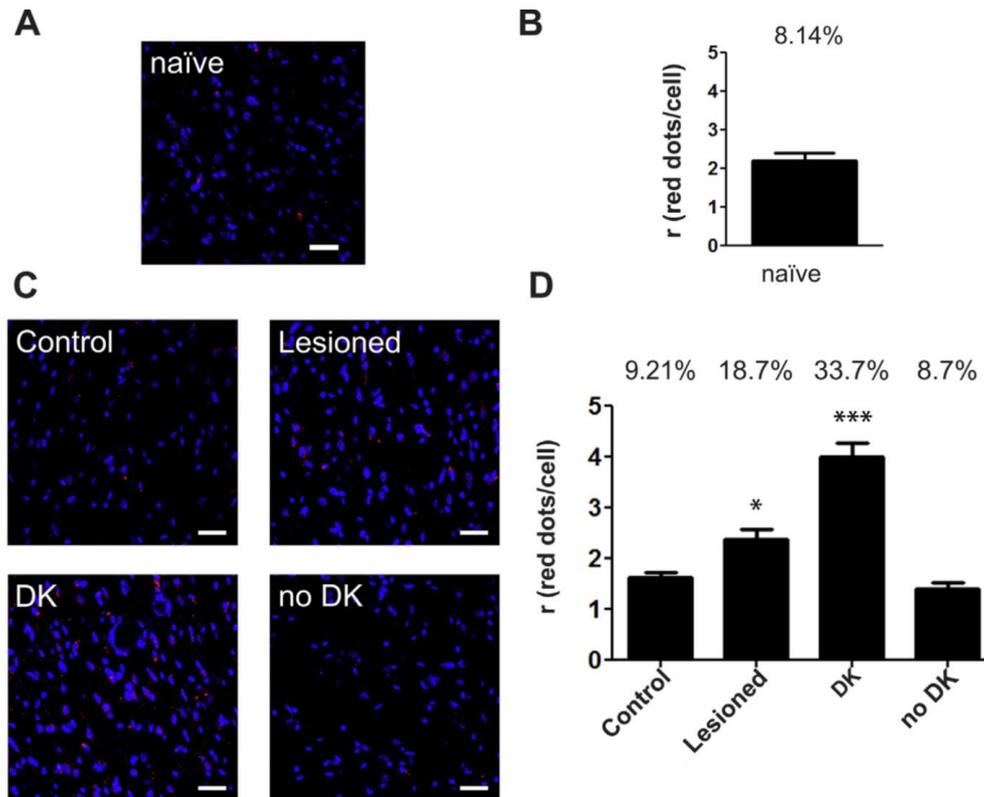


Figura 9. Expresión del complejo CB₁R/CB₂R en el modelo de rata de la enfermedad de Parkinson. Se realizó una PLA para detectar los complejos CB₁R/CB₂R como se describe en Métodos, usando secciones de estriado no lesionadas (naïve) (A-B) o hemiestriatales de ratas lesionadas, así como ratas lesionadas tratadas con levodopa que muestran (DK) o no (no DK) discinesia (C-D). En C y D “control” se corresponde con las secciones del lado no lesionado (izquierdo), mientras que “lesioned” “DK” y “no DK” se corresponde con las secciones del lado lesionado (derecho). Se muestran imágenes de microscopía confocal (4 secciones superpuestas); los complejos heteroméricos aparecen como puntos rojos que rodean los núcleos teñidos con Hoechst en azul. B y D: la relación r (número de puntos rojos/célula que contiene puntos) y el porcentaje de células que contienen uno o más puntos rojos se muestran en los gráficos de barras. Los datos (proporción o porcentaje de células positivas) son la media \pm S.E.M. de los recuentos en 6-8 campos diferentes en cada muestra de cerebro de ratas no lesionadas, lesionadas, y tratadas con levodopa que muestran (DK) o no (sin DK) discinesia (n = 3 en cada grupo). El análisis de ANOVA bidireccional mostró diferencias significativas intergrupales en ratio y porcentaje de células positivas. * p < 0.05, *** p < 0.001 (respecto a naïve) después de la prueba *post hoc* de Bonferroni. Barras de escala: 30 μ M.

4.1.2.10. Heterómeros CB₁R/CB₂R en el hipocampo de animales transgénicos

La enfermedad de Alzheimer es una patología que cursa con neuroinflamación (459) (460). También se conoce que algunos receptores están involucrados en procesos neuroinflamatorios. En condiciones normales presentan una baja expresión, pero en condiciones de neuroinflamación están sobreexpresados en muestras de pacientes con AD. Algunos ejemplos bien caracterizados son los receptores A₂A de adenosina, que aparecen en células gliales en el hipocampo y en corteza cerebral de pacientes con AD (461) o el receptor CB₂, cuyos niveles de expresión están aumentados junto con el de los marcadores gliales en la corteza frontal en pacientes con AD (318). Aunque los modelos transgénicos no reflejan adecuadamente todos los aspectos de la AD humana (462), la neuroinflamación ha sido descrita en ratones APP_{Sw, Ind}, incluyendo la existencia

de astrocitos reactivos y microglía activa (443). Se aisló hipocampo de crías de dos días obtenidas del cruce de ratones $APP_{Sw, Ind}$ y *wild type* y se genotiparon individualmente y clasificaron como ratones no transgénicos (control) y ratones APP heterocigotos, que en edad adulta muestran placas amiloides, neuroinflamación con microglía reactiva y déficits cognitivos (443). Se prepararon cultivos primarios de microglía de hipocampo y se llevaron a cabo ensayos de PLA para detectar cambios en la expresión del heterómero CB_1R/CB_2R . Mientras que solo el 5% de las células cultivadas procedentes de animales no transgénicos mostraron puntos rojos, en el caso de las células procedentes de animales heterocigotos $APP_{Sw, Ind}$ el porcentaje ascendió al 83%. Además, el número de puntos rojos por célula aumentó de 1,5 a 6 (Figura 10A-B). Curiosamente, empleando un anticuerpo para detectar activación del complejo MHC de clase II se observó un fenotipo microglial activado en cultivos de animales heterocigotos, pero no en cultivos procedentes de los controles (Figura 8B).

4.1.2.11. La señalización de los receptores cannabinoides en células microgliales procedentes de ratón $APP_{Sw, Ind}$ es similar a la de las células activadas con LPS e IFN- γ

Se emplearon cultivos primarios de animales no transgénicos (barras negras) y animales $APP_{Sw, Ind}$ (barras blancas) para caracterizar la señalización funcional cannabinoide. Los cultivos primarios de microglía de hipocampo se trataron con forskolina (0,5 μ M) tras tratarse con los agonistas selectivos de los receptores cannabinoides, JWH133 o ACEA, o con los endocannabinoides anandamida o 2-AG y se determinó el cambio en los niveles de cAMP. Se observó que la activación del receptor CB_1 en ratones control disminuyó levemente los niveles de cAMP (aproximadamente un 20%), mientras que la activación con el agonista de CB_2R no mostró ningún efecto significativo. Por otro lado, en cultivos procedentes de ratón $APP_{Sw, Ind}$ la disminución en los niveles de cAMP fue mayor (aproximadamente un 40%) tras activar con los agonistas selectivos de los receptores CB_1 y CB_2 (Figura 10C). La activación simultánea con los dos agonistas selectivos dio lugar a un fenómeno de *cross-talk* negativo entre ambos receptores en los animales control, al contrario que en los animales transgénicos, donde este *cross-talk* resultó ser positivo (Figura 10C). Curiosamente, el tratamiento con endocannabinoides dio lugar a respuestas más potentes en muestras obtenidas de animales heterocigotos. En los ensayos de DMR llevados a cabo en cultivos microgliales se observó que la activación de CB_2R en muestras control tuvo un efecto reducido, y en cuanto al receptor CB_1 se observó un fenómeno de *cross-talk* negativo. De nuevo, la estimulación con el agonista de CB_2R en células de microglía procedentes de animales $APP_{Sw, Ind}$ mostró un efecto significativo y una potenciación de la señalización del receptor CB_1 (Figura 10D). La tendencia común observada en las células microgliales activadas es un aumento de los heterómeros CB_1R/CB_2R y un cambio cualitativo y cuantitativo en la señalización de los receptores de cannabinoides.

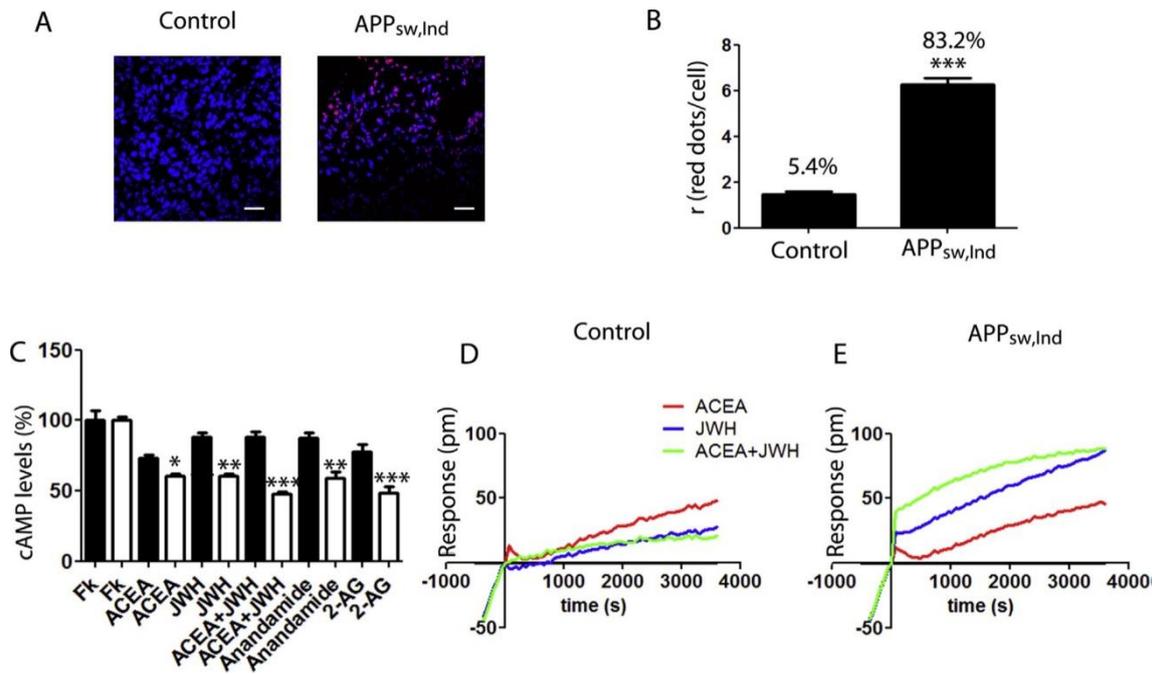


Figura 10. Expresión de complejos CB₁R/CB₂R y su función en el ratón APP_{sw,Ind} modelo de la enfermedad de Alzheimer. A: Se analizaron mediante PLA cultivos primarios de microglía de hipocampo de ratón no transgénico de dos días de edad (control, barras negras) y de ratones APP_{sw,Ind} (barras blancas). Se utilizaron anticuerpos primarios específicos contra CB₁R (1/100) o CB₂R (1/100). Las imágenes de microscopía confocal (4 planos consecutivos) muestran complejos heteroméricos como puntos rojos y núcleos teñidos con Hoechst (azul). Barra de escala: 30 μ m. El gráfico de barras muestra el número de puntos rojos/célula que contiene puntos; el número de encima de cada barra indica el porcentaje de células que presentan puntos rojos. Los valores son la media \pm S.E.M. de 6 experimentos diferentes. En todos los casos, se realizó un *one-way* ANOVA y un análisis *post hoc* de comparación múltiple de Bonferroni como análisis estadístico (***) $p < 0.001$, *versus* control). C: se estimularon cultivos primarios de microglía de hipocampo de ratones no transgénicos de dos días de edad (control, barras negras) y APP_{sw,Ind} (barras blancas) con ACEA 200 nM, JWH133 100 nM o ambos, o con anandamida 200 nM o 2-AG 200 nM, seguido por 15 minutos de tratamiento con forskolina 0,5 μ M y se determinaron los niveles de cAMP. Los valores son la media \pm S.E.M. de 6 experimentos diferentes. En todos los casos, se realizó un análisis *one-way* ANOVA y un análisis *post hoc* de comparación múltiple de Bonferroni como análisis estadístico (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ *versus* el tratamiento con forskolina). D-E: Curvas de DMR en tiempo real obtenidas usando cultivos primarios de microglía de hipocampo de los controles (izquierda) y APP_{sw,Ind} (derecha) estimulados con ACEA 200 nM (rojo), JWH133 100 nM (azul) o ambos (verde). Los valores son la media \pm S.E.M. de 6 experimentos diferentes.

4.2. Efecto *in vitro* del etanol sobre la señalización de los receptores CB₂, GPR55 y el heterómero CB₂R/GPR55

El alcohol es una droga socialmente aceptada entre la población general, y su consumo es legal en todos los países no musulmanes una vez alcanzada la mayoría de edad. A lo largo de la historia el alcohol ha sido el centro de numerosos ritos religiosos y actos sociales, y en la actualidad no ha perdido dicho valor. Este hecho da lugar a comportamientos inadecuados de consumo que pueden provocar la aparición de diversas patologías, y en última instancia, adicción alcohólica. Se estima que solo en Estados Unidos cerca de 18 millones de personas sufren algún tipo de desorden relacionado con el consumo de alcohol (datos del *National Institute on Alcohol Abuse*

and Alcoholism, NIAAA por sus siglas en inglés). A nivel mundial esta cifra alcanza el 5% de la población total, unos 350 millones de personas.

El etanol ingerido en forma de bebida alcohólica es metabolizado principalmente en el hígado, aunque una pequeña parte puede ser metabolizado en el estómago. En este proceso intervienen diversas enzimas responsables de la oxidación del etanol como la enzima alcohol deshidrogenasa y la enzima acetaldehído deshidrogenasa. Cerca del 90% del etanol consumido es procesado por estas, mientras que resto es eliminado por la orina, la respiración o el sudor (395) (397). Cuando el etanol alcanza el torrente sanguíneo y llega al SNC provoca los efectos más evidentes de la intoxicación etílica, interaccionando principalmente con los receptores GABA_A y NMDA (401). El consumo crónico de etanol da lugar a neuroadaptaciones que provocan cambios en los perfiles de expresión de estos receptores, disminuyendo la expresión de GABA_A y aumentando la del receptor NMDA, lo cual da lugar al fenómeno conocido como *delirium tremens*, que provoca convulsiones, hipertermia y, si no se trata adecuadamente, la muerte (414).

El etanol no afecta únicamente a los receptores GABA_A y NMDA. Se sabe que el sistema endocannabinoide está directamente implicado en el abuso de bebidas alcohólicas. La actividad del receptor CB₁ favorece la predisposición al consumo de esta droga. Esto se demostró en animales habituados a la ingesta de etanol y tratados con antagonistas cannabinoide como el rimonabant, alterando el patrón de consumo de etanol (419) (420). El etanol también afecta a la expresión de los genes relacionados con el sistema endocannabinoide (427), puede afectar a la inmunomodulación mediada por endocannabinoides (463), causa neurodegeneración neonatal debido a un aumento en la expresión del receptor CB₁ (430) y es capaz de generar depresión sináptica corticoestriatal relacionada con el sistema endocannabinoide (434). El receptor CB₁ es el GPCR más abundante en el SNC, y está implicado en la regulación de diversos procesos como la excitabilidad neuronal y su relación con el consumo de alcohol está bien establecida. Aunque CB₂R era considerado un receptor periférico presente en células del sistema inmune, ha sido demostrada su presencia en SNC, no únicamente en microglía sino también en neuronas en regiones como el hipocampo (239). El receptor GPR55, que fue durante un tiempo considerado como un nuevo receptor cannabinoide, también está expresado en el SNC y ha sido descrita su presencia, al igual que el receptor CB₂, en el hipocampo (254). Esta región se ve claramente afectada por el consumo de etanol, dando lugar a fenómenos de *blackout* o de pérdida transitoria de la memoria (412). Teniendo en cuenta estos antecedentes y el potencial del sistema endocannabinoide en el abuso de alcohol, es necesario analizar cómo el alcohol afecta, cuantitativamente y/o cualitativamente, la farmacología de estos receptores.

4.2.1. Materiales y métodos ²

4.2.1.1. Reactivos

El JWH133 y el CP55940 se obtuvieron de Tocris Bioscience (Bristol, R.U.). El LPI se adquirió de Merck/Millipore (Billerica, Massachusetts, E.E.U.U.) y el etanol de PANREAC (Castellar del Vallès, Barcelona, España).

4.2.1.2. Vectores de expresión

Se utilizaron cDNAs que codifican para los receptores CB₂ y GPR55 humanos, y se amplificaron mediante PCR sin su codón de parada. Posteriormente se clonaron, en pauta de lectura, en un vector que contiene la secuencia de Rluc (pRluc-N1, Perkin-Elmer®, Wellesley, MA, E.E.U.U.) usando cebadores sentido y antisentido que contienen sitios de restricción para los enzimas HindIII y BamHI, o subclonados, en pauta de lectura, en un vector que contiene la secuencia de pEYFP (Clontech laboratories Inc., Heidelberg, Alemania) usando cebadores específicos sentido y antisentido que contienen sitios de restricción para BamHI y KpnI. De esta forma obtuvieron las siguientes proteínas de fusión: CB₂R-YFP, GPR55-Rluc y GPR55-YFP.

4.2.1.3. Cultivo celular y transfección transitoria

En los experimentos se utilizaron células HEK-293T, que proceden de riñón de embrión humano. Las células HEK-293T se cultivaron en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco® by life technologies™, Maryland, E.E.U.U.) suplementado con L-Glutamina 2 mM, ampicilina 50 µg/mL, estreptomina 50 µg/mL y 5% de suero fetal bovino (FBS) con el sistema del complemento inactivado por calor. Todos los productos son de Gibco® by life technologies™. Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda con un 5% de CO₂. Posteriormente, las células se transfectaron transitoriamente con los cDNAs correspondientes, utilizando NaCl 150 mM, polietilenimina (PEI, Sigma-Aldrich) 2 µM no ramificada y medio DMEM sin suplementar, tal y como se describe en Carriba et al., 2008 (446). Pasadas 4 horas la mezcla de transfección se reemplazó por medio DMEM suplementado. Las células transfectadas se emplearon en los correspondientes experimentos 48 horas después del procedimiento de transfección. Los cultivos primarios de neuronas del hipocampo se obtuvieron de fetos de rata *Sprague-Dawley* (día embrionario 19). Las células se aislaron como se describe en Hradsky et al., 2013 (447). Las células se mantuvieron en medio neurobasal suplementado con L-glutamina 2 mM, ampicilina 50 µg/mL, estreptomina 50 µg/mL y 2% de suplemento de B27 durante 12 días hasta su uso en el experimento correspondiente. De nuevo todos los productos que se utilizaron son de la marca Gibco® by life technologies™.

4.2.1.4. Pretratamiento con etanol

Las células HEK-293T transfectadas o los cultivos primarios de neuronas de hipocampo se trataron con etanol a una concentración final equivalente a 1.5 g/L de etanol en sangre (32,5 mM). En total se llevaron a cabo tres pretratamientos independientes consistentes en tres tiempos distintos antes de cada experimento: Un pretratamiento de treinta minutos, dos horas o dos días antes del procedimiento experimental en células HEK-293T transfectadas, o de treinta minutos, dos horas o 6 días antes del experimento con cultivos primarios.

4.2.1.5. Ensayo de BRET

Para llevar a cabo el ensayo de BRET las células HEK-293T se transfectaron transitoriamente con una cantidad constante de cDNA que codifica para GPR55-Rluc y con cantidades crecientes de cDNA que codifica para CB₂R-YFP. 48 horas después de la transfección las células se ajustaron a 2 mg/mL de proteína mediante un ensayo de Bradford (Bio-Rad) utilizando albúmina de suero bovino como estándar. Para cuantificar la expresión de YFP, la fluorescencia se leyó en un aparato MITHRAS LB 940 HTS III *multimode reader* (BERTHOLD Technologies) excitando a 485 nm. Para las mediciones de BRET se recogieron lecturas un minuto después de la adición de coelenterazina H (P.J.K. GmbH, Kleinblittersdorf, Alemania) utilizando de nuevo un aparato MITHRAS LB 940 HTS III *multimode reader* recogiendo las señales a 535 nm. Para cuantificar la luminiscencia del receptor fusionado con Rluc, se llevó a cabo una lectura a los 10 minutos tras la adición de la coelenterazina H. El BRET se expresó como mili unidades de BRET (mBU, (Emisión₅₃₀/Emisión₄₈₅) X 100).

4.2.1.6. Determinación de cAMP intracelular

Dos horas antes de iniciar el experimento, se cambió el medio de las células HEK-293T o neuronas por medio DMEM (Gibco®) sin suplementar. Las células resuspendidas en medio de cultivo que contenía HEPES 5mM, zardaverina 32 µM y BSA 0,1%, PH 7,4, se colocaron en microplacas de 384 pocillos (2.500 células/pocillo), y se estimularon con los agonistas selectivos durante 15 minutos antes de añadir forskolina 5 mM o vehículo durante otros 15 minutos. Las lecturas se realizaron 1 hora después de la incubación con anticuerpos a 25 °C. Las medidas de la transferencia homogénea de energía fluorescente resuelta en el tiempo (HTRF) se realizaron con un kit LANCE® *Ultra cAMP* (Perkin-Elmer®). La fluorescencia se analizó a 665 nm con un lector de microplacas PHERAstar Flagship equipado con un módulo óptico para HTRF (BMG Lab Technologies, Offenburg, Alemania).

4.2.1.7. Ensayo de fosforilación de ERK

Para determinar la fosforilación de ERK1/2 se sembraron las células en microplacas transparentes de 96 pocillos Deltalab a una concentración de 40.000 células/pocillo y se incubaron durante 24 horas. Entre 2 y 4 horas antes del experimento, el medio de cultivo empleado se reemplazó por medio DMEM sin suplementar. Tras esto las células se trataron a 25 °C durante 10 minutos con vehículo o con los agonistas específicos. Las células se lavaron con PBS frío antes de añadir tampón de lisis (tratamiento de 20 minutos). 10 µL de cada sobrenadante obtenido en la lisis se colocaron en una placa ProxiPlate de 384 pocillos. La fosforilación de ERK1/2 se determinó utilizando el kit AlphaScreen SureFire (Perkin Elmer) siguiendo las instrucciones del proveedor y con un aparato EnSpire Multimode Plate Reader (Perkin-Elmer).

4.2.1.8. Ensayo de distribución dinámica de masa (DMR)

Para el ensayo de DMR con células HEK-293T o neuronas de hipocampo las células se sembraron en placas de 384 pocillos con microsensores (Perkin-Elmer) con una concentración de 10.000 células por pocillo y se mantuvieron en incubación a 37 °C y 5% de CO₂. Antes del ensayo las células se lavaron dos veces con HBSS que lleva HEPES 20 mM, DMSO 0,1 %, pH 7,15, y se incubaron durante 2 horas con este mismo tampón (24 °C, 30 mL/pocillo). Tras esto la placa se escaneó y se registró la señal basal durante 10 minutos antes de añadir 10 µL de los antagonistas específicos durante 30 minutos, seguido de la adición de 10 µL de los agonistas específicos. Todos los compuestos del ensayo se disolvieron en el tampón previamente descrito. La DMR se registró durante al menos 5.000 segundos en un aparato EnSpire Multimode Plate Reader (Perkin-Elmer). Los resultados se analizaron usando el *software* EnSpire Workstation v 4.10.

4.2.1.9. Ensayo de movilización de calcio

Para llevar a cabo el ensayo de movilización de calcio intracelular, las células HEK-293T se transfectaron transitoriamente con cDNA que codifica para GPR55 y para CB₂R, así como para el sensor de calcio modificado GCaMP6 (Addgene, Cambridge, Massachusetts, E.E.U.U.), que contiene la secuencia de la proteína fluorescente cpGFP, de la proteína calmodulina y del péptido *CaM-interacting M13*. Al unir calcio, la calmodulina modificada GCaMP6 cambia su estructura y permite a la proteína cpGFP ser excitada y emitir fluorescencia (451). 48 horas después de la transfección las células se ajustaron a 4 mg/mL de proteína mediante un ensayo de Bradford (Bio-Rad) utilizando albúmina de suero bovino como estándar. La determinación de la movilización de calcio intracelular se realizó empleando un EnSpire Multimode Plate Reader (Perkin-Elmer). Los datos se expresan como la señal fluorescente emitida por la calmodulina modificada GCaMP6 menos la señal fluorescente emitida por las células en reposo (basal).

4.2.1.10. Procedimientos de inmunotinción

Las células se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 15 minutos y se lavaron con PBS (NaCl 138 mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM, K₂ HPO₄ 1,5 mM) que contenía glicina 20 mM para inactivar los grupos aldehído, y antes de la permeabilización con PBS-glicina y detergente Tritón X-100 al 0,2 % durante 5 minutos. Las células HEK-293T se trataron durante 1 hora con PBS-glicina con albúmina de suero bovino (BSA) al 1% y se incubaron durante una hora con un anticuerpo monoclonal anti-Rluc de ratón (Chemicon-Millipore corp). Posteriormente se incubaron con anticuerpos secundarios anti-ratón conjugados a Cy3 (1/200, 1 h; Jackson ImmunoResearch, Baltimore, E.E.U.U.). Tras varios lavados las muestras se montaron con Mowiol al 30% (Calbiochem) y se observaron en un microscopio confocal Leica SP2 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

4.2.1.11. Ensayo *in situ* de ligación por proximidad

Las secciones de corteza cerebral que estaban incluidas en parafina se desparafinaron como se describe en el apartado 3.12 de materiales y métodos generales.

Posteriormente se trataron con TBS que contenía Tritón X-100 al 0,01% durante 10 min y se lavaron con TBS antes de usar los anticuerpos primarios específicos para los receptores CB₂ y GPR55 (monoclonal anti-CB₂R 1/100; y anti-GPR55 de conejo, respectivamente, de Santa Cruz Technologies y Cayman Chemical). La PLA se llevó a cabo con sondas que detectan anticuerpos de conejo o de ratón (sonda Duolink II PLA anti-*Rabbit* plus y sonda Duolink II PLA anti-*mouse* minus). Los núcleos se marcaron con Hoechst (1/200; Sigma-Aldrich). Las muestras se montaron con Mowiol al 30% (Calbiochem). Finalmente, las muestras se observaron en un microscopio confocal Leica SP2 (Leica Microsystems) equipado con un objetivo de inmersión en aceite 63X apocromático (N.A. 1.4) y líneas láser de 405 nm y 561 nm. En cada campo se tomaron imágenes en dos canales diferentes, uno para cada marcaje (azul para los núcleos, rojo para los heterómeros), y siguiendo el eje Z, con una distancia entre imágenes de un micrómetro. El número de células que contienen uno o más puntos rojos frente al total de células (número de núcleos en azul) y la ratio (r, número de puntos rojos/célula) en las células que contienen puntos, se determinó mediante el software Duolink Image.

4.2.2. Resultados experimentales ²

4.2.2.1. Identificación de complejos CB₂R/GPR55 mediante inmunotinción

En primer lugar, se llevaron a cabo ensayos de inmunocitoquímica en células HEK-293T transfectadas con el cDNA para CB₂R-YFP, GPR55-YFP o CB₂R-YFP y GPR55-Rluc. Las proteínas de fusión que contenían la proteína fluorescente amarilla se detectaron por la propia fluorescencia de YFP. Por otro lado, la construcción GPR55-Rluc fue detectada con un anticuerpo específico frente a Rluc (Chemicon-Millipore corp) y un anticuerpo secundario fusionado a Cy3 (señal roja, Jackson ImmunoResearch). En todos los casos, la fluorescencia se detectó mediante microscopía confocal. En la Figura 11B se puede observar que tanto el receptor CB₂ como el receptor GPR55 se expresaban principalmente a nivel de membrana plasmática. Además, en amarillo se pudo observar un alto nivel de colocalización entre ambos receptores a nivel de membrana plasmática. Seguidamente se analizó el efecto del tratamiento con etanol a una concentración equivalente a 1,5 g/L de EtOH, es decir, 32,6 mM (la concentración de etanol en sangre más frecuente que se alcanza tras un consumo abusivo de esta sustancia (464)), a tres tiempos diferentes de exposición: 30 min, 2 h y 2 días. La expresión observada de los receptores fue similar a la de las células sin tratar. Ambos receptores se expresaban principalmente a nivel de membrana plasmática donde mostraron un alto grado de colocalización (Figura 11B).

4.2.2.2. Efecto del etanol sobre el heterómero de receptores CB₂/GPR55

La formación de heterómeros entre los receptores cannabinoides CB₂ y GPR55 fue descrita por primera vez en 2014 por Balenga y colaboradores (68). Además, la expresión de los receptores CB₂ y GPR55 ha sido descrita en diferentes tejidos, entre ellos, en el hipocampo de roedores (238) (465). Por otro lado, se han asociado los principales efectos del consumo de bebidas alcohólicas a esta región cerebral. Así, en este proyecto nos propusimos determinar si el etanol era capaz de afectar la formación de heterómeros entre los receptores CB₂ y GPR55. Para ello se transfectaron células

HEK-293T con una concentración constante de cDNA (0,3 μg) para GPR55-Rluc y concentraciones crecientes de cDNA para CB₂R-YFP (0,5 μg -4 μg) y se realizó un ensayo de transferencia de energía por proximidad. Se obtuvo una curva de BRET saturable (BRET_{max} de 540 \pm 60 mBU y BRET₅₀ de 60 \pm 20, línea negra), indicando la existencia de complejos heteroméricos entre CB₂R y GPR55 (Figura 11A). Paralelamente se analizó el efecto del etanol sobre la formación de heterómeros CB₂R/GPR55. Para ello, células HEK-293T con una concentración constante de cDNA (0,3 μg) para GPR55-Rluc y concentraciones crecientes de cDNA para CB₂R-YFP (0,5 μg -4 μg) fueron tratadas con etanol a diferentes tiempos de exposición (30 minutos, 2 horas y 2 días). La concentración de etanol utilizada fue la equivalente a 1,5 g/L de EtOH. Las curvas de saturación obtenidas bajo el tratamiento con etanol fueron similares a las de las células sin tratar (BRET_{max} de 540 \pm 70 mBU y BRET₅₀ de 90 \pm 30 para el tratamiento de 30 minutos, línea roja; BRET_{max} de 520 \pm 70 mBU y BRET₅₀ de 100 \pm 40 para el tratamiento de 2 horas, línea verde; y BRET_{max} de 530 \pm 70 mBU y BRET₅₀ de 100 \pm 40 para el tratamiento de 2 días, línea azul) (Figura 11A). Estos resultados indican que en presencia de etanol no se ve afectada ni la expresión, ni la estructura del complejo heteromérico entre los receptores cannabinoides CB₂ y GPR55.

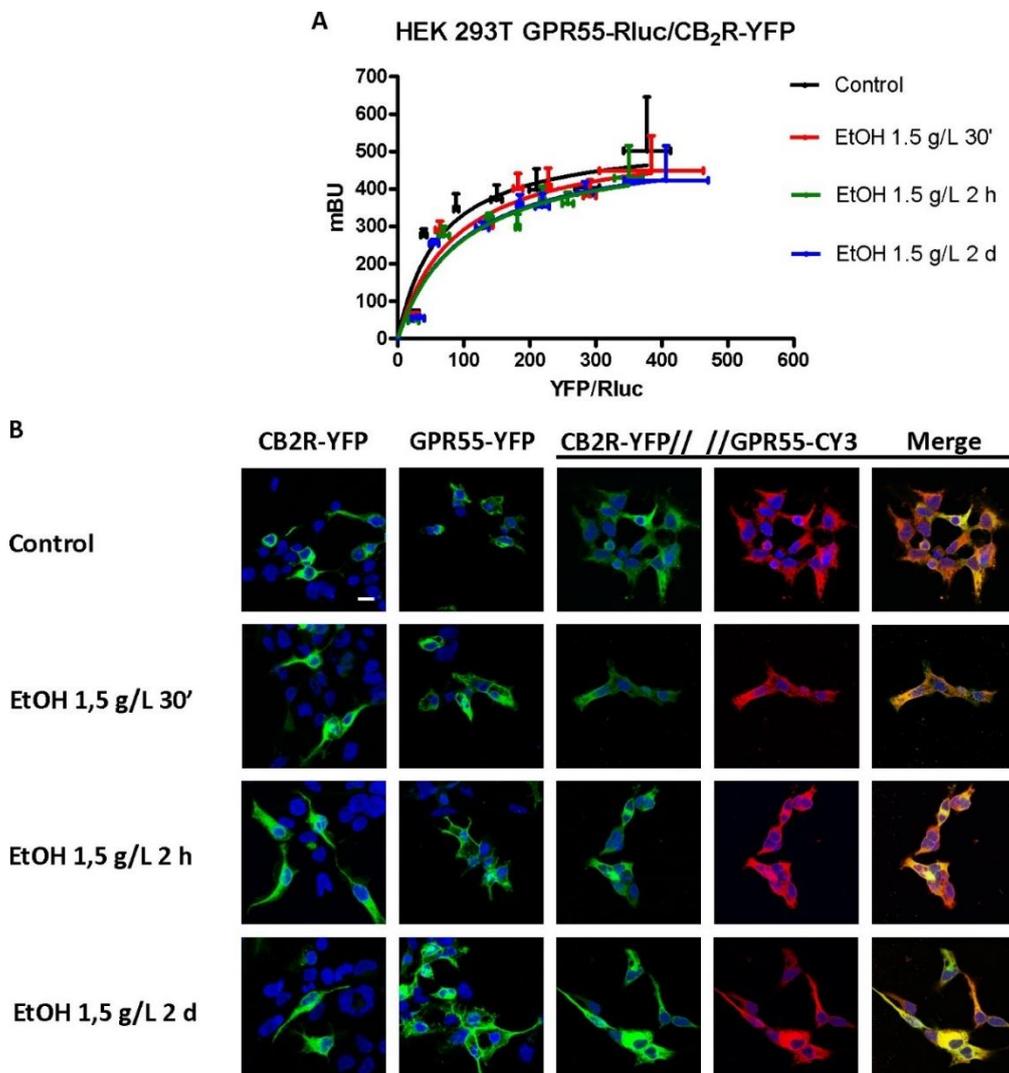


Figura 11. Estudio del efecto del etanol sobre la heteromerización de los receptores CB₂ y GPR55 en células HEK-293T transfectadas. A: Los ensayos de BRET se llevaron a cabo en células HEK-293T

transfectadas con una cantidad constante de cDNA para GPR55-Rluc (0,3 μ g) y cantidades crecientes de cDNA para CB₂R-YFP (0,5-4 μ g) y pretratadas o no (línea negra) con diferentes tiempos de etanol a 1,5 g/L (30 minutos (línea roja), 2 horas (línea verde) o 2 días (línea azul)). Los valores son la media \pm S.E.M. de 8 experimentos diferentes realizados en duplicados. B: Se llevó a cabo una inmunocitoquímica en células HEK-293T, pretratadas durante 30 minutos, 2 horas y 2 días con etanol a 1,5 g/L, que expresaban CB₂R-YFP (1,5 μ g), GPR55-YFP (1,5 μ g) o CB₂R-YFP (1,5 μ g) y GPR55-Rluc (0,3 μ g). Los receptores fueron detectados por la propia fluorescencia amarilla de la proteína YFP, o mediante un anticuerpo primario específico de ratón anti-Rluc (rojo) y un anticuerpo secundario fusionado a Cy3. Las imágenes se tomaron con un microscopio LEICA SP2. La colocalización de ambos receptores se muestra en amarillo. Barra de escala: 15 μ M.

4.2.2.3. Efecto del etanol en la movilización de cAMP intracelular

En segundo lugar, nos planteamos estudiar el efecto del etanol sobre la funcionalidad del heterómero de receptores CB₂/GPR55. El receptor CB₂ se acopla a proteína G α_i , por lo que su activación con agonistas específicos provoca la inhibición de la Adenilato ciclasa y una disminución en los niveles de cAMP intracelulares. Por esta razón, se llevaron a cabo ensayos de determinación de los niveles de cAMP intracelular en células HEK-293T transfectadas con el cDNA de los receptores CB₂, GPR55 o ambos (1,5 μ g), y pretratadas o no con etanol (1,5 g/L) a distintos tiempos: 30 minutos (barras rojas), 2 horas (barras verdes) y 2 días (barras azules) (Figura 12A-C). En células que expresaban únicamente el receptor CB₂ el tratamiento con el agonista cannabinoide CP55940 (200 nM) provocó una disminución significativa de los niveles de cAMP intracelulares inducidos por Forskolina (0.5 μ M) (Figura 12A). Cuando estas células fueron pretratadas con etanol previamente a la estimulación con CP55940, se observó una reducción significativa de los niveles de cAMP intracelular, similar a la observada en las células que no fueron tratadas con etanol y sin que existieran diferencias entre los distintos tiempos de pretratamiento (Figura 12A). Seguidamente se analizaron las células que expresaban únicamente el receptor GPR55. Estas células se estimularon con el agonista específico del receptor GPR55, LPI (1 μ M). No se observaron cambios significativos en los niveles de cAMP inducidos por forskolina (Figura 12B). Estos resultados se pueden explicar porque el receptor GPR55 se encuentra acoplado a proteína G α_{13} y su activación no induce cambios en los niveles de cAMP intracelular. Evidentemente, el pretratamiento de estas mismas células con etanol tampoco provocó ningún efecto. En las células que coexpresaban ambos receptores, el tratamiento con CP55940 provocó una reducción importante de los niveles de cAMP inducidos por forskolina (Figura 12C), mientras el tratamiento con LPI no provocó cambios significativos en los niveles de cAMP (Figura 12C). Por otro lado, el cotratamiento con CP55940 y LPI en células que expresaban simultáneamente CB₂R y GPR55 provocó una disminución de los niveles de cAMP inducidos por forskolina sin cambios significativos comparada con la estimulación única con CP55490. Estos resultados indican que la activación del receptor GPR55 no ejerce ningún efecto modulador sobre la señalización del receptor CB₂ a nivel de AMPc. Cuando estas células fueron pretratadas con alcohol a distintos tiempos previo al tratamiento con CP55940, o con CP55490 y LPI, no se observaron diferencias entre los distintos tiempos de pretratamiento y la condición control (Figura 12C).

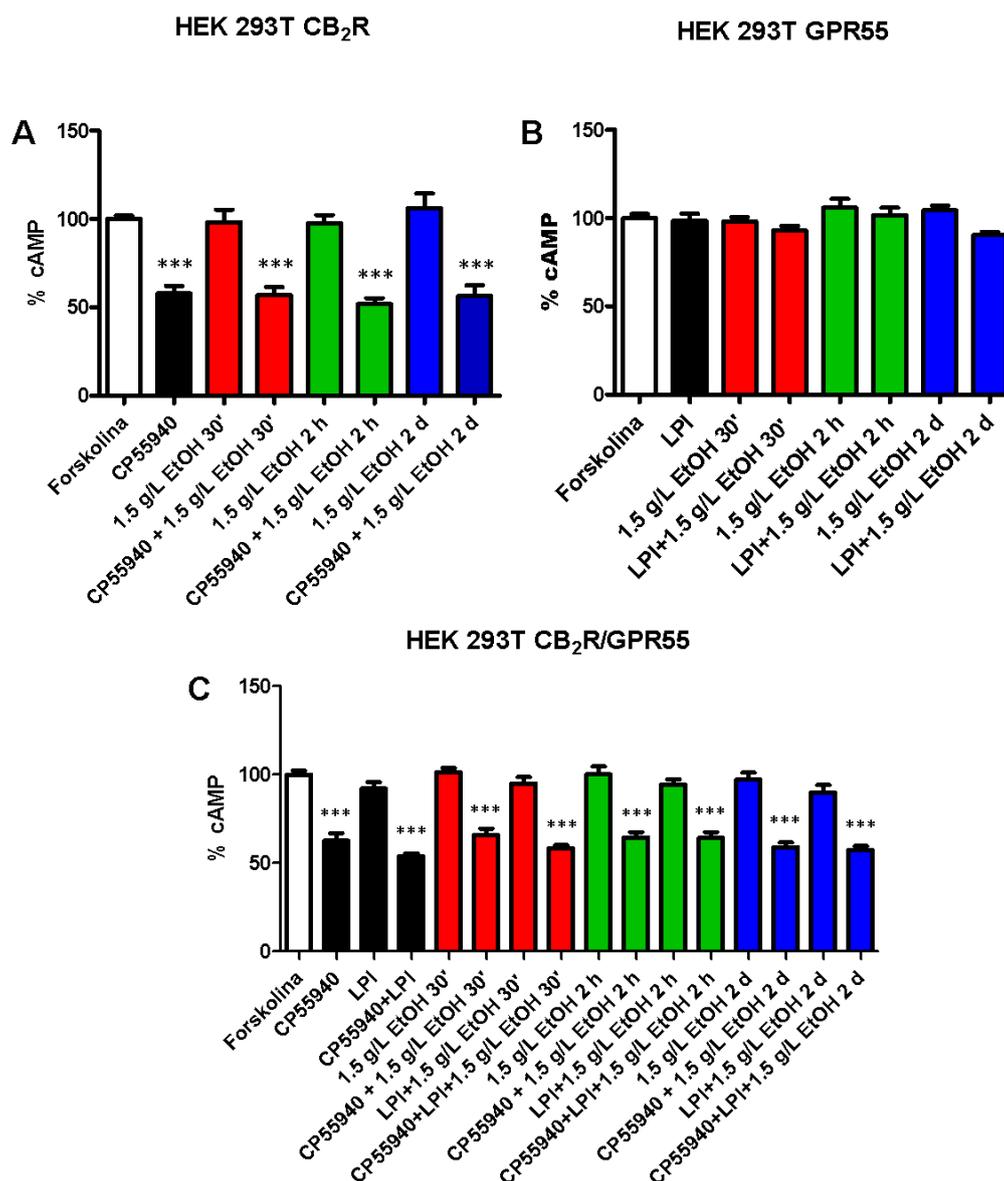


Figura 12. Efecto del etanol sobre la señalización por cAMP del receptor CB₂: Se transfectaron células HEK-293T con los cDNA que codifican para los receptores CB₂ (1,5 µg) y GPR55 (1,5 µg) y se pretrataron o no (barras negras) con etanol (1,5 g/L) durante 30 minutos (barras rojas), 2 horas (barras verdes) y dos días (barras azules), seguido de la estimulación con los agonistas selectivos del receptor CB₂ (CP55490, 200 nM) o GPR55 (LPI, 200 nM). Las bajadas en los niveles de cAMP inducidos por forskolina se determinaron como se describe en el apartado de métodos. Los valores son la media ± SEM de 6 experimentos diferentes. El análisis estadístico consiste en un *one-way* ANOVA y un análisis *post hoc* de comparación múltiple de Bonferroni (***) $p < 0,001$ versus el tratamiento con forskolina).

4.2.2.4. El pretratamiento con etanol inhibe la señalización del receptor CB₂ en la vía de las MAPK

Los GPCR se caracterizan porque son capaces de activar una amplia cascada de señalización, que podemos dividir entre las señales dependientes de proteína G α , donde encontramos la regulación de los niveles de cAMP, y la vía independiente de proteína G α , donde encontramos la fosforilación de las MAPK. Para poder analizar el efecto del etanol sobre los receptores de estudio en la señalización vía $\beta\gamma$, células HEK-293T

transfectadas con el receptor CB₂ o GPR55 o ambos fueron activadas con sus ligandos específicos (Figura 13A-C).

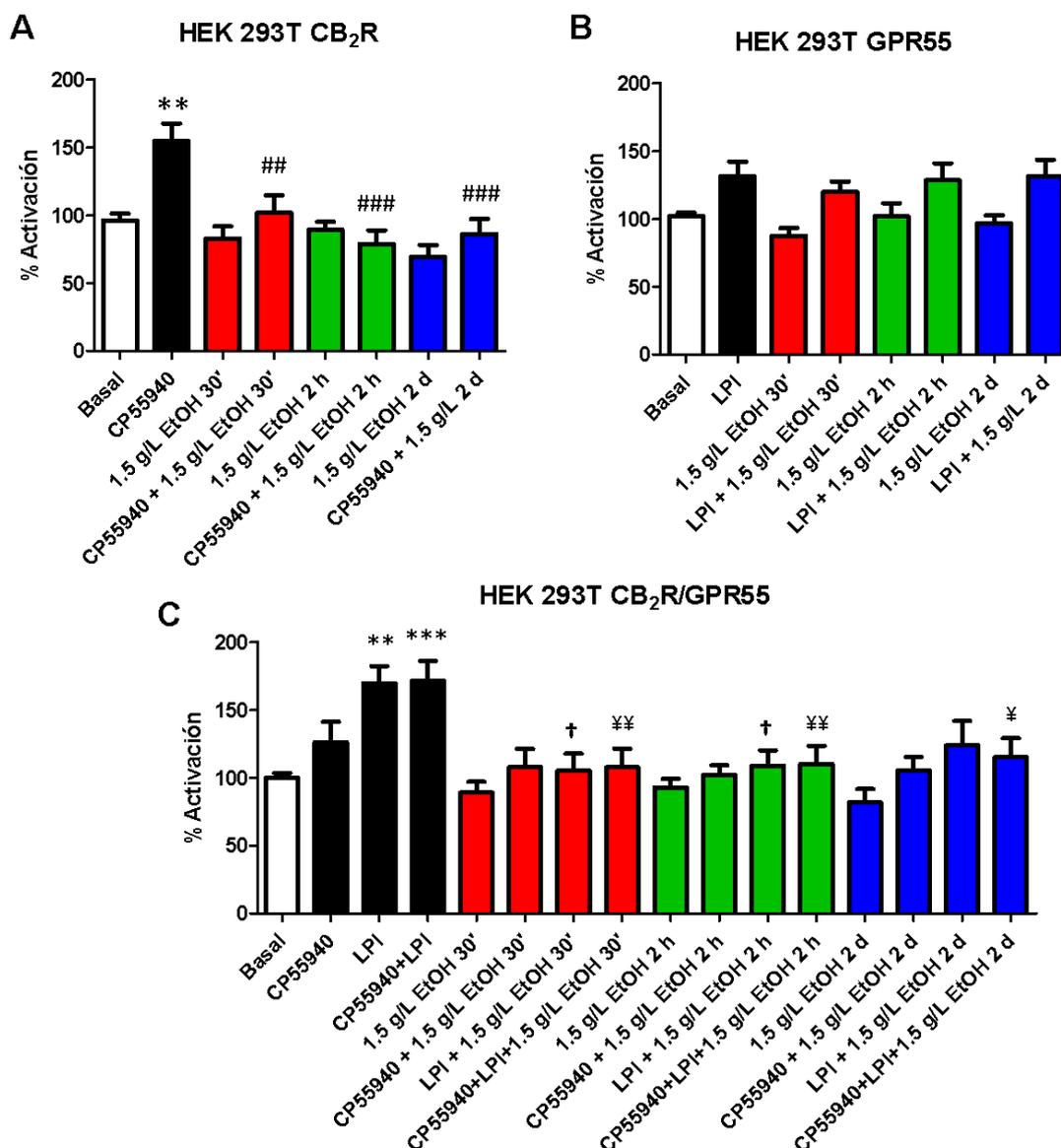


Figura 13. Efecto del tratamiento con etanol sobre la fosforilación de ERK1/2 en células que expresan CB₂R, GPR55 o el heterómero CB₂R/GPR55. Células HEK-293T que expresaban CB₂R (1,5 µg), GPR55 (1,5 µg) o ambos receptores se pretrataron o no (barras negras) con etanol (1,5 g/L) durante 30 minutos (barras rojas), 2 horas (barras verdes) y 2 días (barras azules). Las células se trataron con los agonistas de CB₂R y GPR55 (CP55940 200 nM para CB₂R y LPI 1 µM para GPR55) por separado en las células que expresan uno de los receptores, o por separado y en combinación en las células que expresan ambos receptores. La fosforilación de ERK1/2 se analizó empleando un kit AlphaScreen SureFire (Perkin Elmer). Los valores son la media ± S.E.M. de 6 experimentos diferentes. Se empleó un *one-way* ANOVA y un análisis *post hoc* de comparación múltiple de Bonferroni como análisis estadístico (** p < 0,01, *** p < 0,001 *versus* basal; † p < 0,05 *versus* tratamiento con LPI en ausencia de etanol; ‡ p < 0,05, ‡‡ p < 0,01 *versus* tratamiento combinado de CP55940 y LPI en ausencia de etanol).

Se observó que la activación del receptor CB₂ con el agonista cannabinoide CP55940 (200 nM) provocó un incremento significativo en la fosforilación de la proteína ERK1/2 con respecto al basal. Por otro lado, el tratamiento con el agonista selectivo de GPR55, LPI (1 µM) en células transfectadas únicamente con el receptor GPR55 no provocó aumentos significativos de la fosforilación de ERK1/2 con respecto al basal. De manera

interesante, hay que resaltar que en células transfectadas con ambos receptores, el tratamiento con CP55490 provocó una señal inferior a la observada en células que expresaban únicamente el receptor CB₂. Es decir, en presencia de GPR55 la señalización del receptor CB₂ se encuentra bloqueada parcialmente. Por otro lado, el receptor GPR55 sí mostró una señal específica mientras la coactivación simultánea de ambos receptores mostró una señal inferior a la suma de las señales individuales, es decir, se produjo un efecto de *cross-talk* negativo a nivel de MAPK (Figura 13C). Seguidamente nos propusimos ver el efecto del etanol en las mismas células a tres tiempos de tratamiento diferentes (etanol (1,5 g/L) a 30 minutos (barras rojas), 2 horas (barras verdes) y dos días (barras azules)). En las células que expresaban únicamente CB₂R el pretratamiento con etanol provocó una inhibición de la fosforilación de ERK1/2 inducida por el agonista cannabinoide CP55940. Sin embargo, no hubo diferencias entre los distintos tiempos de tratamiento con etanol (Figura 13A). En células que expresaban el receptor GPR55, el resultado obtenido al pretratar con etanol resultó similar a la ausencia de etanol, es decir, una señalización débil (Figura 13B). Finalmente, en las células que expresaban ambos receptores, el tratamiento con etanol previo a la estimulación con CP55940 y/o con LPI a distintos tiempos provocó una fuerte inhibición en la fosforilación de ERK1/2 (Figura 13C). Estas diferencias fueron significativas en los tratamientos a 30 minutos y 2 horas, aunque leves en el tratamiento de 2 días.

4.2.2.5. El pretratamiento con etanol potencia la señalización del receptor GPR55 en la movilización de calcio intracelular

Ha sido descrito que el receptor GPR55 se encuentra acoplado a proteína G α_{13} . Así, la activación del receptor da lugar a un incremento característico en los niveles de calcio intracelular. Por este motivo se llevaron a cabo ensayos de movilización de calcio intracelular en células HEK-293T transfectadas con los cDNA de los receptores CB₂ y GPR55 mediante el uso del sensor de calcio modificado GCaMP6. Tal y como cabía esperar, debido a su acoplamiento a proteína Gi, el tratamiento con el agonista cannabinoide CP55940 (200 nM) en células transfectadas únicamente con el receptor CB₂ no provocó movilización de calcio intracelular (Figura 14A). Estas células fueron pretratadas o no con etanol a distintos tiempos (30 minutos (en rojo) y 2 horas (en verde)) y no se obtuvo señal específica en ningún caso. En células HEK-293T que expresaban únicamente GPR55, la activación con el ligando endógeno de GPR55, LPI (1 μ M), mostró una curva característica de movilización de calcio intracelular (Figura 14B). De forma interesante, el pretratamiento con etanol provocó cambios en la señalización por calcio, observándose un incremento en la movilización del calcio intracelular en los tratamientos con etanol, siendo este efecto más marcado en el tratamiento a 2 horas que a 30 min (Figura 14B). De manera sorprendente, en células que coexpresaban CB₂R y GPR55 el tratamiento con CP55940 produjo movilización de calcio intracelular (Figura 14C). Los resultados fueron similares cuando estas mismas células fueron pretratadas con etanol (Figura 14C). El tratamiento con LPI en células que expresaban CB₂R y GPR55, ya fueran pretratadas o no con etanol, mostró una fuerte reducción en la movilización de calcio intracelular, lo que podría indicar una regulación negativa del receptor CB₂ sobre la señalización de GPR55 (Figura 14D). El cotratamiento con CP55940 y LPI en estas mismas células, tratadas o no con etanol, mostró también una fuerte inhibición de la movilización de calcio intracelular, de lo que se puede deducir la existencia de *cross-talk*

negativo entre ambos receptores en esta vía de señalización (Figura 14E). Además, el pretratamiento de estas células con etanol no provocó alteraciones significativas.

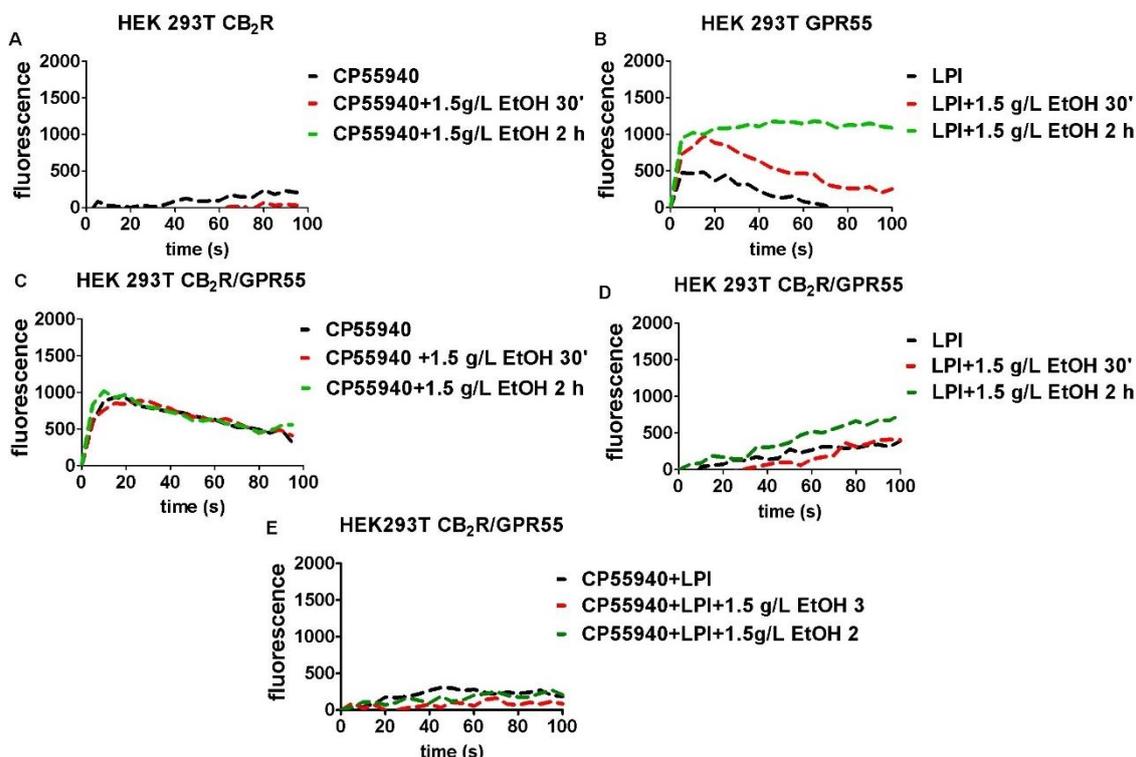


Figura 14. Influencia del etanol en la señalización por calcio. Células HEK-293T que expresaban CB₂R (1,5 µg), GPR55 (1,5 µg) o ambos y el sensor de calcio GCaMP6 (1 µg) se pretrataron o no (línea negra) con etanol (1,5 g/L) durante 30 minutos (línea roja) y 2 horas (línea verde). Tras estos tiempos, las células se incubaron con los agonistas de CB₂R (CP55940 200 nM) y GPR55 (LPI 1 µM) por separado en las células que expresan uno de los receptores o por separado y en combinación en las células que expresan ambos receptores. El resultado se representa como la fluorescencia emitida por el sensor GCaMP6 durante un periodo de 100 minutos. Los valores son una representación característica de 5 experimentos diferentes.

4.2.2.6. Efecto del etanol sobre el heterómero de receptores CB₂/GPR55 mediante el ensayo de DMR

El ensayo de DMR es una técnica muy novedosa en la cual, mediante luz reflectada se pueden detectar pequeños cambios en la masa celular debidos a la señalización celular mediada por la activación de receptores. Células HEK-293T fueron transfectadas con el cDNA de los receptores CB₂ y/o GPR55. El tratamiento con CP55940 (200 nM) en células transfectadas únicamente con CB₂R produjo una curva específica de DMR (Figura 15A). Además, el pretratamiento con etanol a 30 minutos y 2 horas provocó una disminución de la señal de activación inducida por el agonista CP55940, sin que hubiera una diferencia clara entre ambos pretratamientos con etanol (Figura 15A). Este pequeño efecto puede ser debido a la inhibición de la vía de las MAPK inducida por el alcohol sobre el receptor CB₂. El tratamiento con el agonista de GPR55, LPI, en células transfectadas únicamente con el receptor GPR55 mostró una curva significativa de DMR (Figura 15B). Sin embargo, el pretratamiento con etanol no afectó la señalización inducida por el agonista LPI, puesto que el resultado obtenido fue similar al del tratamiento únicamente con LPI (Figura 15B). Este resultado puede ser debido a que el pretratamiento con etanol no induce ningún efecto sobre la vía de las MAPK en el

receptor GPR55, que además no señaliza vía cAMP. En último lugar, el tratamiento con el agonista CP55940 en células transfectadas con ambos receptores mostró una curva de DMR muy pequeña que aún se vio reducida con el pretratamiento con etanol, en consonancia con los resultados descritos en la vía de las MAPK, Indicando un efecto negativo del receptor GPR55 sobre la señalización del receptor CB₂ (Figura 15C). El tratamiento con LPI en las células que coexpresaban ambos receptores mostró también una curva de señalización de DMR (Figura 15D), que resultó menor a la obtenida en el tratamiento con LPI en células transfectadas únicamente con GPR55, sugiriendo una posible regulación negativa del receptor CB₂ sobre la señalización de GPR55. El tratamiento con LPI en las células que fueron sido pretratadas con etanol fue similar al de las células sin pretratar, un resultado similar al observado en las células que expresaban únicamente el receptor GPR55 (Figura 15D). Finalmente, en el cotratamiento con CP55940 y LPI se obtuvo una curva específica de DMR, que no mostró cambios significativos con el pretratamiento con etanol (Figura 15E).

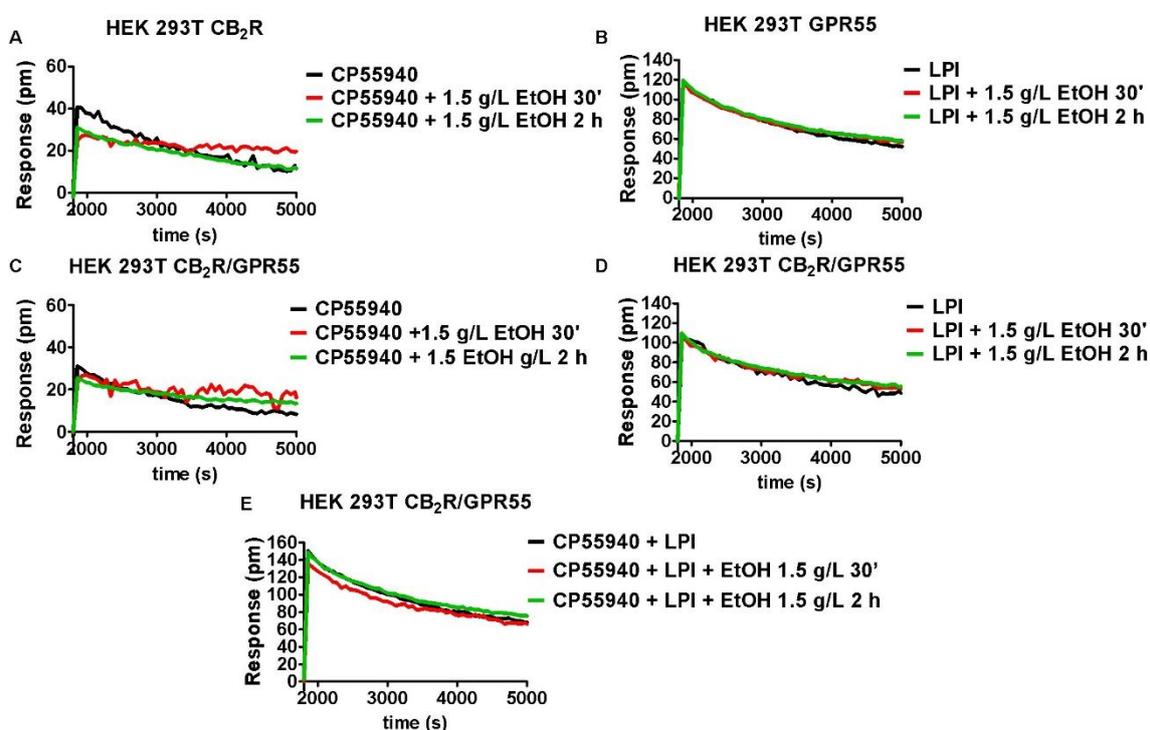


Figura 15. Efecto del etanol en el ensayo de DMR en células HEK-293T que expresan CB₂R y/o GPR55. Células HEK-293T que expresan CB₂R (1,5 µg), GPR55 (1,5 µg) o ambos se pretrataron o no (líneas negras) con etanol (1,5 g/L) durante 30 minutos (líneas rojas) y 2 horas (líneas verdes). Las células se trataron con los agonistas específicos de CB₂R y GPR55 (CP55940 200 nM para CB₂R y LPI 1 µM para GPR55) por separado en las células que expresan uno de los receptores, o por separado y en combinación en las células que expresan ambos receptores. Los valores son una representación característica de 5 experimentos diferentes.

4.2.2.7. Efecto del etanol en la movilización de cAMP intracelular en cultivos primarios de neuronas de hipocampo

Una vez caracterizada la funcionalidad del heterómero CB₂R/GPR55 en presencia o ausencia de diferentes tiempos de pretratamiento con etanol en células HEK-293T, nos propusimos avanzar hacia un modelo más fisiológico. Para ello se emplearon cultivos

primarios de neuronas de hipocampo, una región afectada en la adicción alcohólica. En primer lugar, nos propusimos estudiar los niveles de cAMP intracelulares. Los cultivos primarios de neuronas de hipocampo también expresan el receptor CB₁. Así, se utilizó el agonista selectivo de CB₂R JWH133, además del agonista cannabinoide no selectivo CP55940, que es capaz de activar tanto a CB₁R como a CB₂R, para poder analizar el efecto específico del etanol sobre el receptor CB₂ (Figura 16).

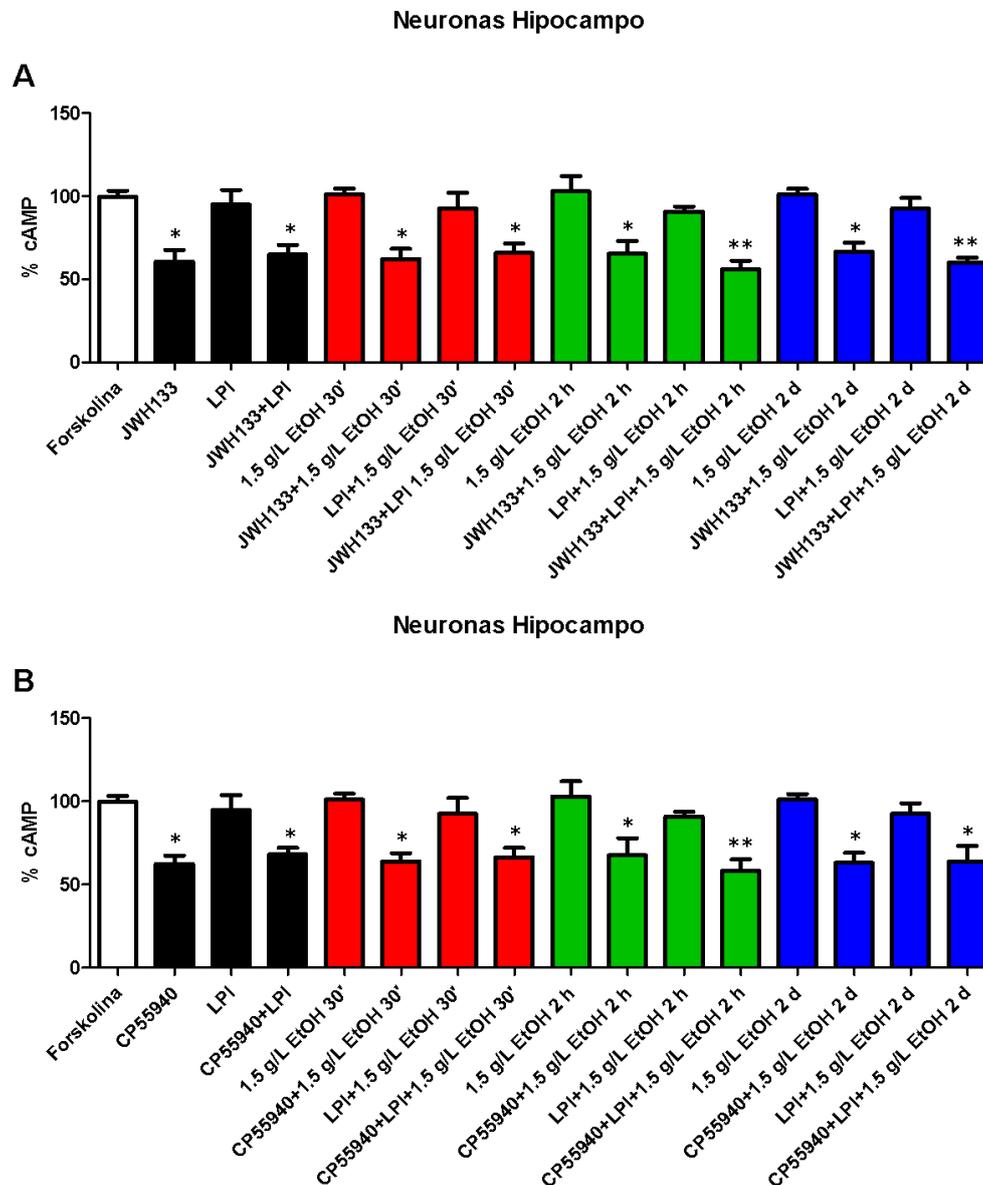


Figura 16. Efecto del etanol en la señalización por cAMP en neuronas de hipocampo de rata: Cultivos primarios de neuronas de hipocampo se trataron o no (barras negras) con etanol (1,5 g/L) durante 30 minutos (barras rojas), 2 horas (barras verdes) y 6 días (barras azules) y se incubaron con agonistas específicos de CB₂R (CP55940 y JWH133) y de GPR55 (LPI). Los niveles de cAMP inducidos por forskolina se determinaron como se describe en los métodos. Los valores son la media \pm SEM de 4 experimentos diferentes. El análisis estadístico consiste en un *one-way* ANOVA y un análisis *post hoc* de comparación múltiple de Bonferroni (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ versus forskolina).

El tratamiento de los cultivos primarios de neuronas de hipocampo con el agonista selectivo de CB₂R, JWH133 (200 nM), provocó una disminución significativa de los niveles de cAMP inducidos por forskolina (Figura 16A) parecida a la inducida por el tratamiento con el agonista cannabinoide CP55940 (200 nM) (Figura 16B). Además, el

tratamiento con el agonista específico de GPR55, LPI (1 μ M), no provocó cambios significativos en los niveles de cAMP, efecto esperado debido al acoplamiento de este receptor a proteína G₁₃ (Figura 16A, B). Por otro lado, el cotratamiento con JWH133 y LPI (Figura 16A) o con CP55940 y LPI (Figura 16B) provocó una disminución significativa de los niveles de cAMP inducidos por forskolina similar al producido por el tratamiento solo con CP55940 o con JWH133 (Figura 16A, B). En todos los casos, las células fueron pretratadas o no con etanol a distintos tiempos: 30 minutos (barras rojas), 2 horas (barras verdes) y 6 días (barras azules). El tratamiento con etanol no provocó ningún cambio significativo en la disminución de los niveles de cAMP inducidos por JWH133, CP55940, LPI o por la combinación de JWH133 y LPI o CP55940 y LPI sobre el efecto de la forskolina (Figura 16A, B). Estos resultados parecen concordar con los observados en las células transfectadas.

4.2.2.8. El pretratamiento con etanol inhibe la señalización cannabinoide vía MAPK en neuronas

A continuación, nos propusimos estudiar la activación de la vía de las MAPK en neuronas procedentes de hipocampo de rata, que se trataron con etanol a distintos tiempos (30 minutos barras rojas, 2 horas barras verdes y 6 días barras azules). Al igual que en los ensayos de determinación de los niveles de cAMP, se empleó el agonista selectivo de CB₂R, JWH133, además del agonista cannabinoide CP55940. El tratamiento con los agonistas CP55940 (200 nM) o JWH133 (200 nM) mostró un incremento de la fosforilación de ERK1/2 respecto al basal, que no resultó significativo para el tratamiento con el agonista no selectivo CP55940 (Figura 17A, B). Por otro lado, el tratamiento con el agonista específico de GPR55 LPI (1 μ M) también produjo un incremento significativo de la fosforilación de ERK1/2 con respecto al basal (Figura 17A, B). Además, el cotratamiento con CP55940 y LPI o JWH133 y LPI, provocó un incremento en la fosforilación de ERK1/2 que no fue superior a la suma de los tratamientos con CP55940, JWH133 y LPI por separado. Este efecto se puede explicar mediante un fenómeno de *cross-talk* negativo entre ambos receptores (Figura 17A, B). El pretratamiento de las diferentes condiciones con etanol a diferentes tiempos (30 minutos (barras rojas), 2 horas (barras verdes) y 6 días (barras azules)) provocó una fuerte inhibición en el aumento en la fosforilación de ERK1/2 inducido por CP55940, JWH133 y LPI en cotratamiento o de manera individual, sin diferencias significativas entre los distintos tiempos de pretratamiento con etanol (Figura 17A, B). Estos resultados parecen concordar con los obtenidos en células HEK-293T transfectadas.

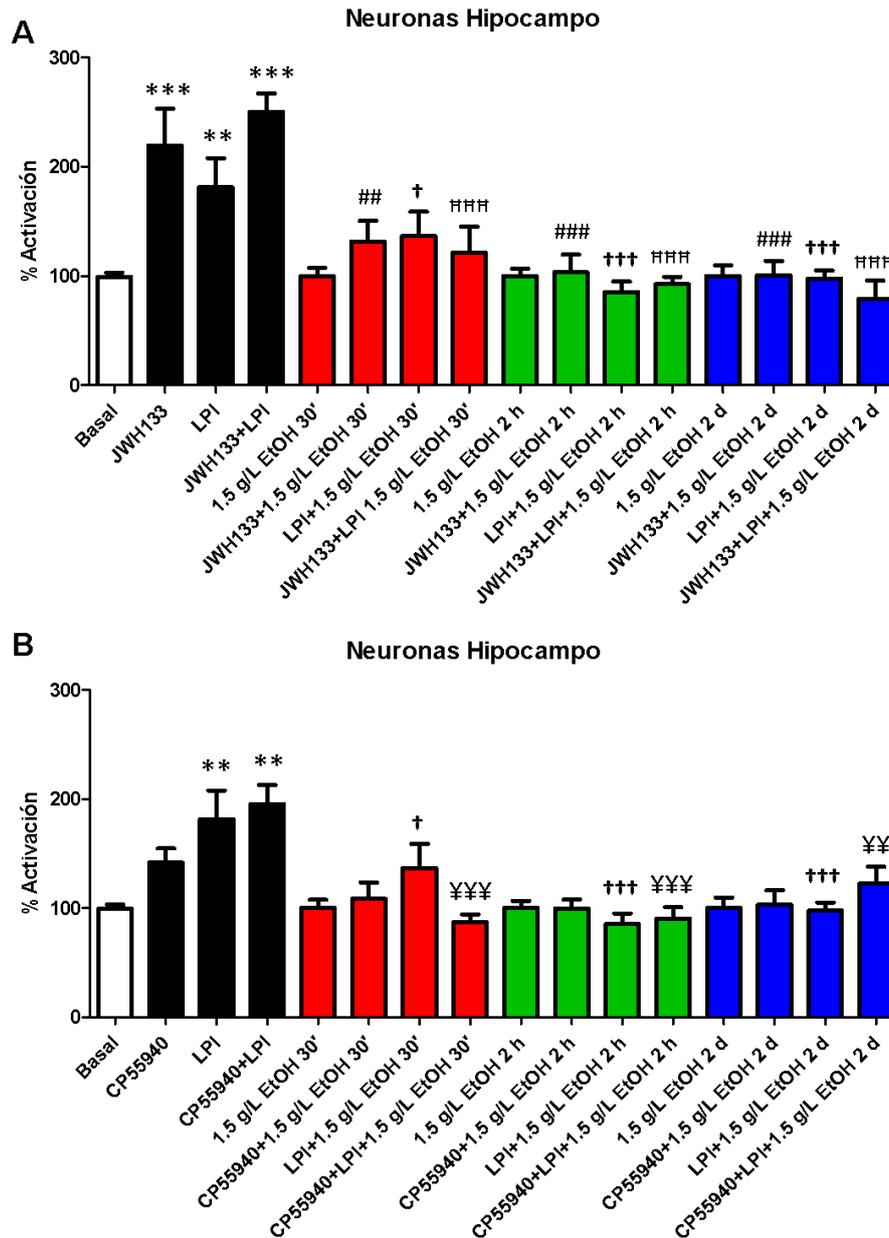


Figura 17. Efecto del etanol sobre la fosforilación de ERK1/2 en neuronas de hipocampo de rata. Las neuronas hipocámpales de rata se pretrataron o no con etanol (1,5 g/L) (barras negras) durante 30 minutos (barras rojas), 2 horas (barras verdes) y 6 días (barras azules). Posteriormente, las células se trataron con los agonistas de CB₂R (CP55940 o JWH133) y GPR55 (LPI). La fosforilación de ERK1/2 se analizó empleando un kit AlphaScreen SureFire (Perkin Elmer). Los valores son la media \pm S.E.M. de 6 experimentos diferentes. Se empleó un *one-way* ANOVA y un análisis *post hoc* de comparación múltiple de Bonferroni como análisis estadístico (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ *versus* basal; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ *versus* tratamiento con JWH133 en ausencia de etanol; † $p < 0,05$, †† $p < 0,01$ *versus* tratamiento con LPI en ausencia de etanol; ¥ $p < 0,05$, ¥¥ $p < 0,01$ *versus* tratamiento combinado de CP55940 y LPI en ausencia de etanol; ### $p < 0,001$ *versus* tratamiento combinado de JWH133 y LPI en ausencia de etanol).

4.2.2.9. Efecto del etanol en el ensayo de DMR en neuronas

Para cerrar la señalización a nivel de cultivos primarios de neuronas hipocámpales, se realizó un ensayo de distribución Dinámica de Masa (DMR). El tratamiento con CP55940 (200 nM) o JWH133 (200 nM) provocó la aparición de una curva característica

de DMR (Figura 18^a). El tratamiento con el agonista de GPR55, LPI (1 μ M), dio lugar a una curva característica de DMR diferente a la observada con los ligandos CP55940 o JWH133 (Figura 18C). Hay que resaltar que el cotratamiento con los agonistas cannabinoides CP55940 o JWH133 y el agonista de GPR55, LPI, en cultivos primarios de neuronas provocó una señal de DMR similar a la suma de los tratamientos obtenidos con CP55940 y LPI por separado. Ello sugiere que en lo referente a redistribución de masa no se detecta el efecto de *cross-talk* negativo observado en otras vías de señalización. Esto puede explicarse porque la señal que más afecta la movilización de la masa celular es la alteración de la función de la AC y la posterior movilización de los niveles de cAMP (Figura 18D). Cuando los cultivos primarios de neuronas fueron pretratados con etanol a distintos tiempos se observó, en los distintos tratamientos, una mayor movilización de la masa celular en el tratamiento a 30 minutos con respecto a las células sin pretratar, mientras que en células pretratadas 2 horas se observó a un pico de señal DMR similar al que se obtuvo en células sin pretratar con etanol (Figura 18 E). Este patrón en la señalización por DMR en cultivos primarios de neuronas de hipocampo, que se repite en todos los tratamientos podría ser explicado o debido a un efecto directo del etanol sobre la fisiología neuronal.

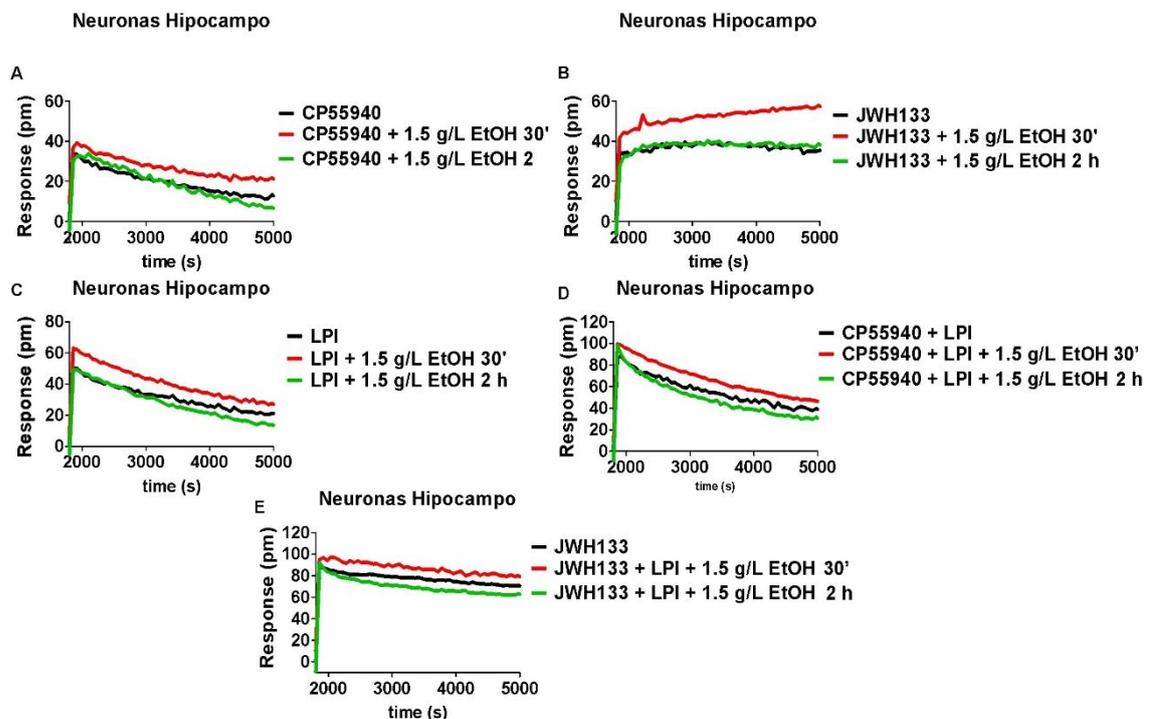


Figura 18. Efecto del etanol en el ensayo de DMR en neuronas de hipocampo de rata. Los ensayos de DMR se llevaron a cabo en neuronas hipocámpales de rata y se pretrataron o no (líneas negras) con etanol (1,5 g/L) durante 30 minutos (líneas rojas) y 2 horas (líneas verdes), y se incubaron con los agonistas: CP55940 y JWH133 para CB₂R, y LPI para GPR55. Los valores son una curva representativa de 5 experimentos diferentes.

4.2.2.10. Expresión del heterómero CB₂R/GPR55 en corteza prefrontal de pacientes alcohólicos

En pacientes con adicción alcohólica tienen lugar diferentes cambios en la expresión de diversos receptores de membrana; entre ellos, el receptor CB₂ o el receptor GPR55.

Por este motivo, se llevaron a cabo ensayos *in situ* de ligación por proximidad en cortes de corteza prefrontal de pacientes alcohólicos. Se utilizaron anticuerpos primarios específicos frente a los receptores CB₂ y GPR55, así como sondas de DNA unidas a los anticuerpos secundarios. La proximidad entre los dos receptores investigados se detectó en forma de puntos rojos sobre núcleos azules (marcados con Hoescht) mediante microscopía confocal. En sujetos control, el porcentaje de células con puntos resultó ser del 16,8% (Figura 19C), mientras que, en pacientes alcohólicos, el porcentaje de células que presentan puntos rojos resultó ser el 24,5% (Figura 19C). El resultado indica que los pacientes alcohólicos presentaban un aumento en el número de células que expresaban el heterómero CB₂R/GPR55 de alrededor de un 10% en corteza prefrontal.

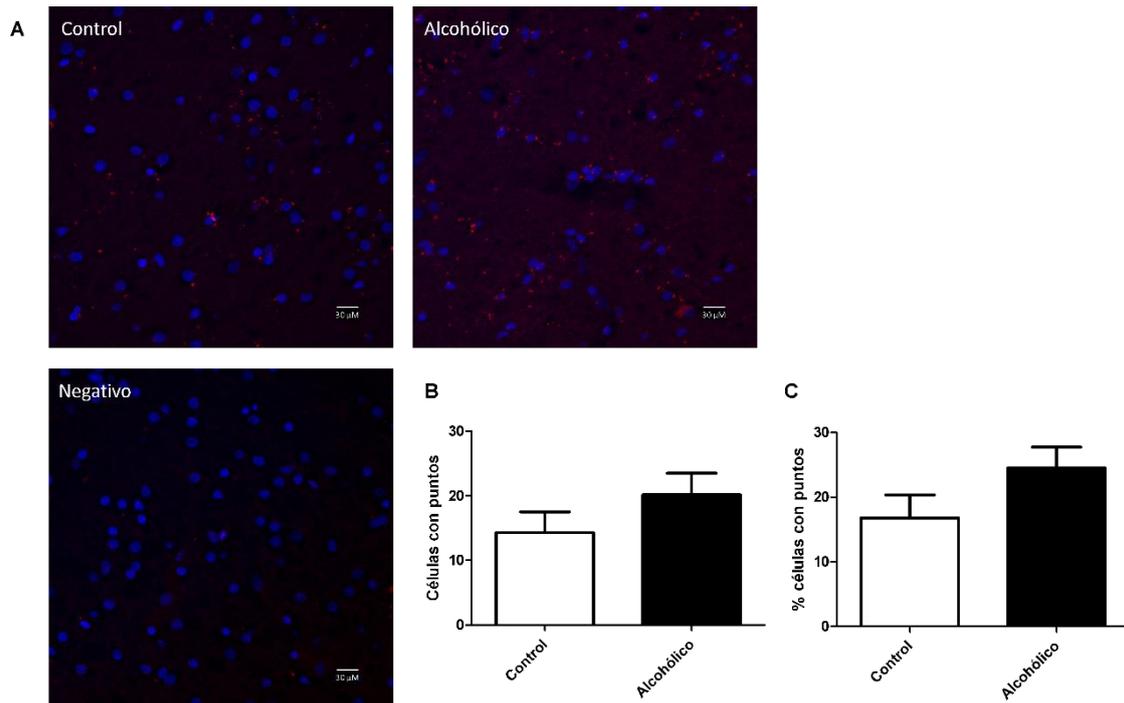


Figura 19. Identificación de complejos de receptores CB₂ y GPR55 en corteza prefrontal de pacientes alcohólicos. Se realizó un ensayo *in situ* de ligación por proximidad (PLA) en cortes de tejido procedentes de corteza prefrontal de pacientes alcohólicos y de controles. Los núcleos se tiñeron con Hoechst (azul) y los heterómeros se distinguen como puntos rojos. B: En el eje Y se muestra el número de células que contienen puntos; C: En el eje Y se muestra el porcentaje de células con puntos. Las imágenes mostradas corresponden a *stacks* de 12 planos secuenciales. Los valores son la media ± S.E.M. de 5 experimentos diferentes. El análisis estadístico consiste en un *one-way* ANOVA y un análisis *post hoc* de comparación múltiple de Bonferroni. Barra de escala: 30 μm.



DISCUSIÓN

5. Discusión

5.1. Regulación de la señalización endocannabinoide mediada por heterómeros de receptores en microglía activada. Papel y relevancia de los receptores CB₁ y CB₂ en la enfermedad de Alzheimer y en la disquinesia inducida por levodopa

El sistema cannabinoide está formado por los ligandos cannabinoideos, las enzimas de síntesis y degradación de estos compuestos y los receptores CB₁ y CB₂. Recientemente, este sistema ha sido relacionado con los procesos de neuroinflamación. Mientras el receptor CB₂ muestra un claro papel neuroprotector, el rol del receptor CB₁ sigue en debate. Más concretamente, el efecto observado de la anandamida sobre la liberación de NO en la microglía activada es mediado principalmente por el receptor CB₂, aunque los resultados descritos en esta Tesis doctoral indican que los efectos mediados por el receptor CB₂ en microglía activada son modulados, al menos en parte, por una interacción directa entre los dos receptores de cannabinoideos. Los datos expuestos también parecen indicar que los endocannabinoideos en microglía en reposo actúan principalmente sobre el receptor CB₁. Desde un punto de vista farmacológico, la activación del receptor CB₁ revela acoplamiento a proteína Gi. Como se deduce del *cross*-antagonismo parcial, la microglía en reposo expresa receptores CB₁ que son capaces de formar heterómeros con receptores CB₂, cuya expresión es reducida y cuyo acoplamiento a proteína Gi no resulta evidente al tratar con el agonista selectivo de CB₂R (JWH133). Sin embargo, el escenario resulta diferente en células N9 o en cultivos primarios activados con LPS e IFN- γ . Además de un marcado aumento en la expresión del receptor CB₂, también se observa un acoplamiento robusto a la maquinaria de señalización celular. En conjunto, los resultados observados en las células activadas encajan con receptores de cannabinoideos existiendo principalmente en forma de complejos heteroméricos cuya estructura cuaternaria y/o su estequiometría es diferente de los complejos heteroméricos en células en reposo. De hecho, los resultados del BRET indican que la distancia entre el donador en el BRET y el aceptor es significativamente diferente en el heterómero CB₁R/CB₂R en células en reposo frente al resultado observado en células microgliales activadas. El *cross*-antagonismo total en la microglía activada también es consistente con la preponderancia en la expresión del heterómero CB₁R/CB₂R. En resumen, el heterómero CB₁R/CB₂R se expresa en microglía activada y, en consecuencia, es una *diana* tanto de compuestos endocannabinoideos como de moléculas de origen natural y sintéticas que actúen sobre los receptores cannabinoideos.

La expresión y señalización diferencial de receptores, que ha sido identificada en todos los modelos analizados, y la existencia del heterómero CB₁R/CB₂R con su señalización particular, pueden explicar la multitud de resultados reportados sobre el papel de los receptores CB₁ y CB₂ en la modulación inmune, activación microglial y en su potencial para combatir la neuroinflamación (466) (467). La señalización cannabinoide en la microglía activada que expresa el heterómero CB₁R/CB₂R puede explicar, en su totalidad o en parte, los efectos antiinflamatorios y no psicotrópicos desencadenados por bajas concentraciones de tetrahidrocannabinol en ratones tratados con LPS (468), la mayor susceptibilidad de los ratones *nock-out* para CB₁R a la neurodegeneración (469) y el papel regulador de CB₁R en la neuroinflamación descrita por Zoppi y colaboradores (470). También podría explicar resultados atribuidos a la actividad independiente de los

receptores cannabinoides debido al hecho de que tanto los agonistas como los antagonistas de CB₁R y CB₂R suprimen de forma similar la inducción de la óxido nítrico sintasa y la generación de especies reactivas del oxígeno en microglía activada (471).

Existe consenso sobre la relevancia del sistema endocannabinoide en la regulación de procesos neurodegenerativos. La microglía y el sistema endocannabinoide microglial resultan atractivos a la hora de fomentar la neuroprotección en enfermedades que cursan con neuroinflamación, como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la corea de Huntington (472) (473) (474) (475). En el modelo de Parkinson generado con 6-hidroxi-dopamina el porcentaje de células que contienen heterómeros CB₁R/CB₂R en el estriado del hemisferio lesionado está aumentado (de 9,2 a 18,7) y en animales con discinesia inducida por tratamientos prolongados con levodopa este incremento es todavía mayor (hasta 33,7). El incremento en la expresión del heterómero debe ser debido a un cambio fenotípico en la microglía que solo ocurre en animales discinéticos, pero no en animales tratados con levodopa y que no muestran movimientos anormales. Estos resultados obtenidos en microglía de rata modelo de PD complementan los observados anteriormente en otro trabajo, en el que empleando el modelo de primate MPTP y centrándose en las neuronas del globo pálido, se observa una reducción marcada de la expresión del heterómero CB₁R/CB₂R en animales discinéticos (454). Teniendo en cuenta toda la información disponible, los medicamentos dirigidos a los receptores cannabinoides microgliales podrían ser capaces, en discinesia, de contrarrestar la disminución en la señalización mediada por los receptores cannabinoides en las neuronas del globo pálido y de reducir la neuroinflamación mediante la supresión de la producción de factores proinflamatorios por la microglía activada.

El *targeting* del receptor CB₁ con agonistas a dosis no psicoactivas, o el *targeting* del receptor CB₂, se considera beneficioso en modelos experimentales de AD. En dichos modelos, los compuestos cannabinoides inducen mecanismos de reparación y proporcionan protección frente a la fosforilación de Tau y la acción del péptido Aβ (476). Los agonistas selectivos del receptor CB₂ presentan un importante potencial en enfermedades en las que existe expresión de factores neuroinflamatorios, desde la isquemia cerebral (477) a la AD (478). Las enzimas microgliales que degradan los compuestos endocannabinoides y/o los receptores CB₂ microgliales son considerados actualmente una opción mejor que los receptores CB₁ de microglía, que presentan una elevada expresión en neuronas y cuya activación provoca efectos psicoactivos (479) (441) (480) (481) (439) (475) (300). Tanto el receptor CB₂ como la FAAH, la enzima responsable de la degradación de la anandamida, son reguladas positivamente de forma selectiva en la glía asociada a las placas presentes en el cerebro de los pacientes con AD (440). De forma interesante, en animales que son el resultado del cruce de individuos pertenecientes a una línea transgénica de AD, 5xFAD, y de animales K.O. para FAAH, existe una menor carga amiloide, un menor número de placas neuríticas y una disminución de la gliosis (442). Una aproximación similar pero empleando ratones K.O. para el receptor CB₂ y ratones APP/PS1 resulta en una producción reducida de moléculas proinflamatorias por parte de la microglía (337).

El receptor CB₁ es el GPCR más abundante del SNC. Se expresa en mayor proporción en neuronas que en la glía, aunque en esta Tesis doctoral se demuestra la regulación positiva de este receptor en microglía activa, donde ha sido reportado su papel

neuroprotector. A pesar de que la expresión del receptor CB₂ en neuronas está restringida a determinadas áreas del cerebro, los resultados muestran niveles bajos de expresión en microglía en reposo y sobreexpresión en la microglía activa, que se correlaciona a su vez con un incremento en el número de heterómeros CB₁R/CB₂R. Además, los resultados complementan evidencias previas de que la expresión del receptor CB₂ puede ser insignificante a menos que se produzca un proceso neuroinflamatorio y la microglía cambie a un fenotipo activo (482) (483). La expresión del receptor CB₂ en el cerebro de pacientes con AD es mayor que la existente en el cerebro de controles sanos de la misma edad y se correlaciona con dos importantes marcadores de la AD, las placas seniles y los niveles de péptido aβ₄₂ (318). Se han descrito resultados similares en modelos animales de la enfermedad. Por ejemplo, estudios llevados a cabo empleando la técnica de PET en ratones que presentan acumulación de péptido amiloide muestran que los ligandos selectivos del receptor CB₂ pueden emplearse como biomarcadores de neuroinflamación (484). Los resultados de este trabajo en cultivos primarios identifican microglía activa y una marcada expresión del receptor CB₂ en ratones APP_{Sw.Ind.}. Este hallazgo está correlacionado con la observación en cultivos primarios de ratones control de que el péptido aβ₁₋₄₂ conduce a una señalización que es similar a la ejercida por LPS e IFN-γ. La expresión del heterómero CB₁R/CB₂R también resulta mayor en microglía de animales APP_{Sw.Ind.}. Estos resultados son consistentes con un mayor fenotipo activado de microglía en el ratón transgénico. Mientras que la pérdida neuronal está ausente en modelos transgénicos de la AD, se podría especular sobre si la elevada expresión del receptor CB₂ en la microglía activada es la base que sustenta la acción neuroprotectora de los cannabinoides. Teniendo en cuenta esta hipótesis, el notable aumento en la expresión del heterómero CB₁R/CB₂R en la microglía activa hace de este complejo una interesante diana para explorar su potencial como regulador de la polarización microglial. Por ejemplo, sería necesario para determinar cómo se regulan, vía cannabinoides, los niveles de citoquinas/quimioquinas y otros factores que son claves en la conversión del fenotipo M1 proinflamatorio al M2 neuroprotector (485).

Como se deduce de los estudios en modelos animales, la PD es otra enfermedad neurodegenerativa que cursa con neuroinflamación. La sobreexpresión del receptor CB₂ ha sido detectada tanto en animales lesionados con 6-hidroxi-dopamina como en animales tratados con LPS y además está correlacionada con la activación microglial (486) (487) (488) (458). Por el contrario, los niveles de endocannabinoides son más elevados en el modelo de inducción de la neuroinflamación que en el modelo neurotóxico (488). Es importante indicar que tanto el agonista cannabinoide no selectivo WIN55212-2 como el agonista selectivo de CB₂R, JWH-105, proporcionan neuroprotección en el modelo MPTP de la PD, en el que se describió previamente que produce una importante activación microglial y sobreexpresión del receptor CB₂ en el mesencéfalo (369). De acuerdo con el importante rol del receptor CB₂ en los procesos de neuroprotección, el uso de ratones K.O. conduce a una mayor toxicidad del MPTP en la sustancia *nigra*. Los resultados obtenidos en este estudio que muestran la expresión del heterómero CB₁R/CB₂R podrían explicar los hallazgos realizados en estudios anteriores (359) (489), en los que se reporta que agonistas cannabinoides no selectivos resultan ser neuroprotectores en el modelo MPTP y que los antagonistas selectivos del receptor CB₁ previenen la neuroprotección nigral así como la reducción de la actividad de la enzima NADPH oxidasa, aumentando la producción de especies reactivas del

Oxígeno y el daño en el DNA. Los efectos mediados por el receptor CB₁ no tienen su origen en los receptores expresados en neuronas, ya que la neuroprotección frente al MPTP no resulta evidente en cultivos enriquecidos en neuronas, sino en cocultivos mesencefálicos de neuronas y microglía. En los resultados de este apartado de la tesis se observa como la expresión de los complejos heteroméricos CB₁R/CB₂R esta incrementada en el hemisferio lesionado de las ratas tratadas con 6-hidroxi-dopamina. Este resultado concuerda con la activación de la microglía en este modelo de PD (490). De forma interesante, los resultados descritos en esta tesis muestran una vuelta a la normalidad en la expresión del heterómero en aquellos animales que han recibido tratamiento con levodopa pero que no presentan discinesia, mientras que tanto el número de células que contienen puntos como el nivel de expresión del heterómero está aumentado en las ratas discinéticas. Dicho hallazgo puede deberse a un mecanismo compensatorio en el que la activación de los receptores cannabinoides puede tener un efecto neuroprotector, o tal vez, la sobreexpresión del heterómero podría desencadenar, en su totalidad o en parte, la manifestación de movimientos discinéticos. Estos resultados, que no se correlacionan con un aumento de microgliosis, constituyen la base sobre la que proponer el heterómero CB₁R/CB₂R como diana a la hora de combatir o prevenir movimientos involuntarios en pacientes que siguen una terapia de reemplazo de la dopamina.

Es importante señalar que los efectos de los cannabinoides en la microglía pueden ser cualitativamente diferentes según la etapa de activación celular. De hecho, los resultados aquí expuestos contrastan con los de otros trabajos, en los que en células microgliales BV-2 activadas por LPS se observa una reducción en la fosforilación de ERK1/2. Por el contrario, en los resultados de esta tesis se observa un incremento de dicha fosforilación al tratar conjuntamente cultivos primarios microgliales con los agonistas selectivos ACEA y JWH133 (471). En el artículo referenciado las células son tratadas simultáneamente con LPS y agonistas cannabinoides, y los niveles de fosforilación de ERK1/2 no se evalúan hasta pasadas 6 horas. En el caso de este proyecto de tesis, las células han sido activadas primero con LPS y γ -IFN, tras lo cual se han añadido los ligandos cannabinoides correspondientes y se ha medido el nivel de fosforilación de ERK1/2 pasados 10 minutos. Esta disparidad de efectos ha de tenerse en cuenta a la hora de encontrar la ventana terapéutica más adecuada para los fármacos cannabinoides.

Como señalan Rom y Persidsky (491), el descubrimiento de agentes terapéuticos dirigidos al receptor CB₂ se ve obstaculizado, entre otras cosas, por la compleja señalización de este GPCR. La naturaleza hidrofóbica de los compuestos cannabinoides y la selectividad funcional son otras fuentes de complejidad. El fenómeno del *biased agonism* y la heteromerización de GPCR pueden generar selectividad funcional, siendo más útil el primero en el descubrimiento de nuevos fármacos y el último en el estudio de la relevancia fisiológica de la señalización de los receptores cannabinoides tanto en la salud como en la enfermedad. Incluso empleando los mismos agonistas selectivos, JWH133 y ACEA, la selectividad funcional resulta evidente comparando las interacciones alostéricas intra-heterómero. De hecho, en todos los modelos celulares, y también cuando se comparan datos en animales transgénicos homocigotos frente a heterocigotos, las interacciones alostéricas negativas receptor-receptor se vuelven positivas en condiciones de activación. Los datos del BRET en células tratadas con LPS e

IFN- γ o sin tratar muestran que los mecanismos alostéricos diferenciales están correlacionados con cambios estructurales dentro del heterómero CB₁R/CB₂R. En conjunto, los resultados expuestos sugieren una conformación activa en el heterómero CB₁R/CB₂R, que sería una interesante diana tanto de cannabinoides endógenos como sintéticos en la microglía reactiva. El descubrimiento de nuevos fármacos debería tener en cuenta la existencia del heterómero CB₁R/CB₂R, así como la dinámica de las interacciones alostéricas en los complejos receptor-receptor en la microglía activada, donde las interacciones entre CB₁R y CB₂R están potenciadas y regulan la función endocannabinoide.

5.2. Efecto *in vitro* del etanol sobre la señalización de los receptores CB₂, GPR55 y el heterómero de receptores CB₂/GPR55

Han sido publicados diferentes estudios que analizan el efecto del etanol procedente del consumo de bebidas alcohólicas y el sistema cannabinoide (492) (493). Existen evidencias de que el potencial adictivo del etanol se encuentra regulado por receptor CB₁, fomentando la búsqueda y el consumo de bebidas alcohólicas, tal y como ha sido descrito en estudios llevados a cabo en roedores (494) (495). Por otro lado, mediante estudios de comportamiento, se han descrito papeles contradictorios para el receptor CB₂. Por ejemplo, en animales *knock-out* para este receptor, el consumo de etanol se ve incrementado en comparación con animales control. Así, estos animales presentan una mayor vulnerabilidad a la adicción al consumo de etanol (496). Además, la activación del receptor CB₂ por agonistas selectivos como el JWH133 parece ejercer un efecto neuroprotector sobre las acciones deletéreas del etanol en áreas neurogénicas (433). Sin embargo, algunos estudios indican que la activación del receptor CB₂ fomenta el consumo de bebidas alcohólicas, de forma similar al receptor CB₁ (497). En otros estudios se ha descrito que el etanol afecta a la señalización del receptor CB₁, potenciando la expresión del receptor y de las enzimas responsables de la síntesis de endocannabinoides, e inhibiendo la fosforilación de ERK1/2 producida por la activación del receptor, conduciendo en último lugar a procesos de neurodegeneración en neonatos expuestos a etanol durante el desarrollo (498).

Hasta el momento, no ha sido descrita una interacción directa del receptor GPR55, un posible candidato a ser miembro de la familia de los receptores cannabinoides, y el etanol. Sin embargo, la presencia de este receptor en áreas cerebrales como el hipocampo, que juega un papel realmente importante en la adicción alcohólica, si ha sido demostrada con anterioridad (499) (500). Los receptores CB₁, CB₂ y GPR55 no funcionan únicamente como unidades monoméricas, sino que se ha descrito la interacción entre ellos para dar lugar a complejos oligoméricos de orden superior (233) (68) (234). Todos los estudios realizados hasta el momento donde se analiza el efecto del etanol sobre el sistema cannabinoide se centran en el efecto del etanol sobre los receptores de cannabinoides en su forma monomérica, y nunca ha sido analizado el efecto del etanol sobre los complejos heteroméricos de receptores cannabinoides. Sin embargo, como ha sido descrito en diferentes estudios, es esta en concreto la estequiometría que pueden mostrar estos receptores en neuronas de hipocampo. Por otro lado, cabe destacar que el etanol es capaz de afectar la composición proteica y la fluidez de la membrana plasmática. También puede interactuar directamente con las

proteínas de membrana y afectar a su estructura y función (501). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este apartado de la tesis, no parece que el etanol sea capaz de romper la interacción entre los receptores CB₂ y GPR55 en ninguno de los tratamientos llevados a cabo (30 minutos, 2 horas y 2 días), como puede comprobarse en los resultados del BRET entre CB₂R y GPR55. Estos resultados se complementan con los estudios de inmunocitoquímica, donde se aprecia la colocalización de ambos receptores a nivel de membrana plasmática tanto en las células sin pretratar con etanol como en las células pretratadas a distintos tiempos. Algunos autores como Madhavan y colaboradores han propuesto un papel inmunomodulador y neuroprotector de los receptores CB₂ y GPR55 en procesos de dependencia alcohólica, donde a largo plazo la expresión de ambos receptores se encuentra aumentada (463). En este proyecto, el análisis mediante PLA en cortes de corteza frontal de pacientes alcohólicos muestra un incremento en el número de células que expresan heterómeros CB₂R/GPR55, marcados como puntos rojos sobre núcleos azules, así como un incremento en el porcentaje de células que expresa heterómeros. Este resultado se corresponde perfectamente con dicho incremento en la expresión de los receptores CB₂ y GPR55 descrito con anterioridad. Es más, se demuestra por primera vez que no únicamente los receptores sufren un aumento de expresión bajo el tratamiento con etanol, sino también los complejos heteroméricos de receptores CB₂/GPR55.

Como ha sido mencionado con anterioridad, el etanol ejerce efectos específicos sobre la señalización de los receptores cannabinoides. En regiones como la corteza prefrontal, el etanol afecta negativamente la señalización cannabinoide alterando la actividad de red y la polarización neuronal en esta área en concreto (502). Mientras, en neuronas del hipocampo, la exposición a etanol también afecta negativamente a la fosforilación de ERK1/2 inducida por activación del receptor CB₂, dando lugar a alteraciones en el condicionamiento de plaza en animales de experimentación (503). Teniendo en cuenta el acoplamiento a proteína Gi del receptor CB₂, uno de los primeros escenarios analizados en este apartado de la tesis fue el estudio de los niveles de cAMP tras la activación del receptor. Una característica interesante del etanol es que este compuesto es capaz de actuar directamente sobre la enzima AC, incrementando los niveles de cAMP (504). Sin embargo, en nuestras condiciones de estudio, donde se emplearon células HEK-293T transfectadas, el etanol no afecta en modo alguno los niveles de cAMP inducidos por forskolina en ninguno de los tiempos estudiados (30 minutos, 2 horas y 2 días). Tampoco parece afectar a la señalización del receptor CB₂ cuando este es activado por el agonista cannabinoide CP55940 en células pretratadas con etanol a distintos tiempos. En los cultivos primarios de neuronas procedentes de hipocampo los resultados obtenidos son similares. En esta región cerebral la señalización del receptor CB₂ potencia la neurotransmisión excitatoria (505), regula positivamente la LTP (506) y juega un papel importante en procesos de generación de memoria y control de la ansiedad (507). En condiciones normales, la kinasa PKA, que es activada por cAMP, es responsable de la activación por fosforilación del factor de la transcripción CREB. El resultado es la transcripción de diversos genes que favorecen la supervivencia celular, la proliferación y la diferenciación de células inmunes (508) (509). Este dato podría guardar relación con el aumento en la expresión del receptor CB₂ y de GPR55 en pacientes alcohólicos. Una característica de la adicción alcohólica es el desarrollo de procesos neuroinflamatorios a nivel del hipocampo (510) (511), donde los receptores cannabinoides muestran un aumento en su patrón de expresión. El

tratamiento con agonistas selectivos para el receptor CB₂ podría conferir neuroprotección en aquellos individuos que abusan del alcohol y paliar algunos de los efectos provocados por el consumo crónico de etanol en forma de bebidas alcohólicas. No solo frente a la neuroinflamación, sino también frente a los procesos de neurodegeneración hipocampal y muerte neuronal que tienen lugar en esta región y que causan alteraciones en la memoria. Por otro lado, atendiendo a los resultados obtenidos, no parece que el heterómero CB₂R/GPR55 juegue un papel importante a nivel de señalización por cAMP en los procesos de alcoholismo, debido a que el pretratamiento con etanol no muestra ningún efecto sobre el heterómero de receptores CB₂/GPR55.

Como se ha comentado con anterioridad, la activación de los receptores CB₂ y GPR55 reduce los niveles de cAMP vía Gi e incrementa el nivel de calcio intracelular vía G₁₃ respectivamente. Sin embargo, a través de las subunidades βγ, estos receptores también pueden producir la activación de la vía de las MAPK. Existen numerosas evidencias que demuestran que la activación del receptor CB₂ a nivel de microglía favorece la producción de citoquinas antiinflamatorias como la IL-10, modulando la respuesta inmune a través de la activación de ERK1/2, JNK y de la inhibición de NF-κB. Por otro lado, en el hipocampo, la activación del receptor CB₂ mediante agonistas selectivos no psicoactivos estimula la proliferación de progenitores neurales a través de la activación de la vía de las MAPK y la fosforilación de ERK1/2 (512). En esta misma región, la actividad cannabinoide induce un papel protector frente a la apoptosis de células neurales y frente a los déficits en el aprendizaje y la memoria en modelos animales con enfermedades neurodegenerativas, probablemente a través de la activación de la vía de las MAPK (513). De forma interesante, cabe destacar que la actividad de las MAPK en el SNC también se ha visto afectada por sustancias adictivas como el etanol. El impacto del consumo de alcohol sobre el hipocampo está bien establecido. La estructura y la función de esta región cerebral se ve comprometida en la adicción alcohólica y puede llegar a afectar seriamente la neurogénesis en adultos. Esto da lugar a numerosos déficits cognitivos y comportamentales, así como a alteraciones en el estado anímico y en la toma de decisiones que afectan de forma permanente a cerca del 75% de los pacientes alcohólicos (514). Este proceso podría estar mediado por una reducción en los niveles de fosforilación de ERK1/2 en el hipocampo, que daría lugar a los ya mencionados déficits cognitivos y a alteraciones en los procesos de memoria, como ocurre en ratones C57BL/6J sometidos a tratamientos con etanol en los cuales la reducción en el nivel de fosforilación de ERK1/2 ha sido asociado a alteraciones en la adquisición de nuevas memorias (515).

En los resultados observados en este apartado de la tesis, el tratamiento con etanol en células HEK-293T transfectadas con el receptor CB₂ a distintos tiempos (30 minutos, 2 horas y 2 días) afecta negativamente a la fosforilación de ERK1/2 inducida por el agonista cannabinoide CP55940. Este resultado parece estar en concordancia con otros trabajos mencionados con anterioridad, y contrasta con el observado en las células transfectadas únicamente con el receptor GPR55, donde el etanol no ejerce ningún efecto sobre la capacidad del receptor activado para inducir la fosforilación de ERK1/2. Sorprendentemente, la exposición a etanol también presenta efectos negativos sobre el heterómero de receptores CB₂/GPR55, donde la fosforilación de ERK1/2 inducida por el agonista de GPR55, LPI, se ve fuertemente inhibida en presencia de etanol. De forma

similar, los resultados obtenidos en los ensayos llevados a cabo empleando neuronas procedentes de hipocampo activadas con los agonistas CP55940, JWH133 y LPI por separado o con CP55940 y LPI o JWH133 y LPI en combinación muestran un efecto negativo del etanol sobre los niveles de fosforilación de ERK1/2. La disminución de la fosforilación de esta proteína debido al efecto del etanol podría justificar el incremento en la expresión de CB₂R en individuos alcohólicos como mecanismo compensatorio, atendiendo únicamente a la señalización de este receptor. Tal y como ha sido descrito con anterioridad en el heterómero de receptores CB₂/GPR55 en sistemas de expresión heterólogos, la activación de la vía de las MAPK inducida por el receptor GPR55 al activarlo con su propio ligando específico, el LPI, se ve potenciada si se compara con la actividad en solitario del receptor GPR55 (68). Los resultados obtenidos al estudiar la señalización del heterómero muestran una inhibición de la fosforilación de ERK1/2 debido a la exposición a etanol, por lo que es posible que el incremento en la expresión de GPR55 en pacientes que sufren adicción alcohólica esté relacionado con la actividad del heterómero CB₂R/GPR55. Nuestros resultados, junto con las evidencias de que el etanol i) afecta la estructura del hipocampo y su función dando lugar a alteraciones en la neurotransmisión cannabinoide y la neurogénesis en adultos (514), ii) altera a través de la inhibición de ERK1/2 el aprendizaje en animales expuestos a etanol (503), y iii) produce neuroinflamación en individuos alcohólicos (516), permitirían postular que la señalización cannabinoide y en concreto la del receptor CB₂ y el heterómero CB₂R/GPR55 son relevantes en el desarrollo de la condición alcohólica y podrían ser dianas de tratamientos paliativos.

La movilización de calcio intracelular es uno de los segundos mensajeros más importantes en la señalización del receptor GPR55 (517). Su señalización ha sido relacionada con diversos procesos patológicos periféricos como el cáncer de mama (265), aunque más recientemente se ha demostrado su expresión en SNC (en el hipotálamo, en el hipocampo, en la corteza prefrontal y en el cerebelo (518)). Aunque el conocimiento acerca de la función de GPR55 en el SNC sigue siendo ciertamente difuso, está descrita su implicación en el control de la neuroinflamación y en la regulación de la neurotransmisión (519). Por otro lado, hay que puntualizar que la activación del receptor CB₂ puede regular la actividad de determinados canales de calcio dependientes de voltaje (520) aunque no tiene al calcio como segundo mensajero. Tal y como era de esperar, la activación del receptor GPR55 en los ensayos de calcio llevados a cabo en células transfectadas únicamente con este receptor mostró un incremento en los niveles de calcio intracelular. A diferencia de los resultados descritos en la fosforilación de ERK1/2, los tratamientos con etanol a diferentes tiempos dieron lugar a un incremento en los niveles de calcio intracelular inducidos por la activación de GPR55 con LPI. La activación de CB₂R en células transfectadas únicamente con este receptor sigue el guion establecido y no produce movilización de calcio. Sorprendentemente, la señalización del heterómero CB₂R/GPR55 resulta opuesta a la de los receptores expresados de manera individual. Mientras que el LPI genera una leve y lineal movilización de calcio, y la combinación de CP55940 y LPI no moviliza el calcio intracelular, la activación del heterómero con el agonista cannabinoide CP55940 es capaz de producir un incremento fuerte en los niveles de calcio. Teniendo en cuenta que la formación del heterómero no afecta a la inhibición de la AC por acción del agonista cannabinoide CP55940 vía CB₂R, no parece que se esté produciendo un cambio en el acoplamiento a proteína G que justifique la señalización del receptor CB₂ en el

heterómero. Tal vez la activación de este receptor en el heterómero CB₂R/GPR55 pudiera ser suficiente para modular la activación del receptor GPR55, dando lugar así al incremento en el nivel de calcio intracelular observado. De forma interesante, los tratamientos con etanol a los tiempos de 30 minutos y 2 horas potencian la señalización del receptor GPR55, siendo mayor el efecto observado en tratamiento de 2 horas de etanol. Aumentando la complejidad del efecto del etanol sobre la señalización de CB₂R, GPR55 y del heterómero CB₂R/GPR55, en la señalización por calcio el receptor GPR55 se ve más afectado a nivel individual, al contrario de lo observado en la fosforilación de ERK1/2, donde es la señalización de CB₂R, individualmente o a través del heterómero CB₂R/GPR55, la que se encuentra afectada por el tratamiento con etanol.

En conjunto, resulta evidente que el etanol afecta de forma directa la señalización de ambos receptores por separado y del heterómero CB₂R/GPR55. Sin embargo, las diferencias observadas en el efecto del etanol en las distintas vías estudiadas requieren un estudio más profundo sobre cuál podría ser el tratamiento adecuado para paliar las acciones negativas del etanol en pacientes alcohólicos. Además, teniendo en cuenta la neuroinflamación constatada en estos mismos pacientes, resulta necesario analizar en futuras investigaciones cual es el efecto del etanol en células gliales. Los resultados obtenidos en dichos estudios podrían añadir todavía más complejidad o bien podrían servir para discernir los pros y los contras de los tratamientos con determinados compuestos cannabinoides.



CONCLUSIONES

6. Conclusiones

Conclusión 1. Mediante el uso de técnicas de transferencia de energía por resonancia (RET) y de microscopía confocal, se demostró que en microglia activada se potencia la expresión del receptor CB₂ y la formación de heterómeros entre CB₁R y CB₂R en células N9. Estos resultados fueron ratificados mediante RT-PCR de mRNA procedente de microglía de estriado de ratón. En modelos animales de la enfermedad de Parkinson y de la enfermedad de Alzheimer, se demostró por primera vez que la formación de heterómeros CB₁R/CB₂R está potenciada en la microglía activada de estos animales.

Conclusión 2. El análisis de la señalización cannabinoide en las células N9 demostró que mientras en células en reposo se observa el fenómeno de *cross-talk* negativo entre los receptores CB₁ y CB₂, en células N9 tratadas con lipopolisacárido e interferón-gamma se observó una *sinergia/cross-talk* positivo. Estos resultados pudieron replicarse en cultivos primarios de microglía de estriado de ratón. El análisis de la señalización cannabinoide en animales modelo de la enfermedad de Parkinson y de la enfermedad de Alzheimer demostró en células de microglia activada una fuerte potenciación a nivel cualitativo y cuantitativo en la señalización mediada por los receptores de cannabinoides.

Conclusión 3. Mediante técnicas de transferencia de energía en un sistema de expresión heterólogo, se demostró que el etanol no altera la estructura de los heterómeros de receptores CB₂ y GPR55. Mediante el ensayo de ligación por proximidad, se demostró en la corteza frontal de pacientes alcohólicos que la heteromerización de los receptores CB₂ y GPR55 está potenciada, con un incremento en el número de heterómeros con respecto a los de individuos sanos.

Conclusión 4. El etanol no altera la señalización por cAMP del receptor CB₂ ni del heterómero CB₂R/GPR55. Sin embargo, la fosforilación de ERK1/2 inducida por activación de los receptores CB₂ y GPR55 es inhibida por acción del etanol, tanto en células transfectadas como en cultivos primarios de neuronas de hipocampo. La señalización por calcio del receptor GPR55 está potenciada por acción del etanol, con un mayor efecto en el tratamiento de 2 horas. Los estudios de DMR permitieron determinar que el etanol afecta negativamente la señalización del receptor CB₂ en células transfectadas únicamente con este receptor. En cultivos primarios de neuronas de hipocampo de rata el etanol potencia la señalización en el tratamiento de 30 minutos.



BIBLIOGRAFÍA

7. Bibliografía

1. Takeda S, Kadowaki S, Haga T, Takaesu H MS. Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence. *FEBS Lett.* 2002;520(1–3):97–101.
2. Lefkowitz R, Roth J, Pricer W PI. ACTH receptors in the adrenal: specific binding of ACTH-125I and its relation to adenylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1970;65(3):745–52.
3. Lefkowitz RJ, Roth J PI. Radioreceptor Assay of Adrenocorticotropic Hormone: New Approach to Assay of Polypeptide Hormones in Plasma. *Science* (80-). 1970;170(3958):633–5.
4. Dixon RA, Kobilka BK, Strader DJ, Benovic JL, Dohlman HG, Frielle T, Bolanowski MA, Bennett CD, Rands E, Diehl RE, Mumford RA, Slater EE, Sigal IS, Caron MG, Lefkowitz RJ SC. Cloning of the gene and cDNA for mammalian bold italic beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature.* 1986;321(6065):75–9.
5. Kobilka BK, Matsui H, Kobilka TS, Yang-Feng TL, Francke U, Caron MG, Lefkowitz RJ RJ. Cloning, sequencing, and expression of the gene coding for the human platelet alpha 2-adrenergic receptor. *Science* (80-). 1987;238(4827):650–6.
6. de Mendoza A, Sebé-Pedrós A R-TI. The evolution of the GPCR signaling system in eukaryotes: Modularity, conservation, and the transition to metazoan multicellularity. *Genome Biol Evol.* 2014;6(3):606–19.
7. Arunkumar Krishnan, Markus Sällman Almén, Robert Fredriksson HBS. The origin of GPCRs: Identification of mammalian like rhodopsin, adhesion, glutamate and frizzled GPCRs in fungi. *PLoS One.* 2012;7(1):1–15.
8. Yaron Hakak, Devin Shrestha, Moira C. Goegel, Dominic P. Behan DTC. Global analysis of G-protein-coupled receptor signaling in human tissues. *FEBS Lett.* 2003;550(1–3):11–7.
9. Stone LS, Molliver DC. In search of analgesia: emerging roles of GPCRs in pain. *Mol Interv* [Internet]. 2009;9(5):234–51.
10. Hanlon CD, Andrew DJ. Outside-in signaling - a brief review of GPCR signaling with a focus on the *Drosophila* GPCR family. *J Cell Sci* [Internet]. 2015;3533–42.
11. Andrea Strasser, Hans-Joachim Wittmann and RS. Binding Kinetics and Pathways of Ligands to GPCRs. *Trends Pharmacol Sci* [Internet]. 2017;38(8):717–32.
12. Ballesteros JA, Weinstein H. Integrated methods for the construction of three dimensional models and computational probing of structure-function relations in G-protein coupled receptors. *Methods Neurosci* [Internet]. 1995;25:366–428.
13. Cvicsek V, Goddard WA, Abrol R. Structure-Based Sequence Alignment of the Transmembrane Domains of All Human GPCRs: Phylogenetic, Structural and Functional Implications. Vol. 12, *PLoS Computational Biology.* 2016. 1-31 p.
14. Metpally RPR, Sowdhamini R. Cross genome phylogenetic analysis of human and *Drosophila* G protein-coupled receptors: application to functional annotation of orphan receptors. *BMC Genomics* [Internet]. 2005;6:106.

15. Schöneberg T, Hofreiter M, Schulz A, Römpler H. Learning from the past: evolution of GPCR functions. *Trends Pharmacol Sci.* 2007;28(3):117–21.
16. Palczewski K, Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Trong I Le, Teller DC, et al. Crystal Structure of Rhodopsin : A G Protein – Coupled Receptor. 2000;739(2000).
17. Lee Y, Basith S, Choi S. Recent Advances in Structure-Based Drug Design Targeting Class A G Protein-Coupled Receptors (GPCRs) utilizing Crystal Structures and Computational Simulations. *J Med Chem* [Internet]. 2017;acs.jmedchem.6b01453.
18. Shonberg J, Kling RC, Gmeiner P, Löber S. GPCR crystal structures: Medicinal chemistry in the pocket. *Bioorganic Med Chem* [Internet]. 2015;23(14):3880–3906.
19. Lee Y, Basith S, Choi S. Recent Advances in Structure-Based Drug Design Targeting Class A G Protein-Coupled Receptors Utilizing Crystal Structures and Computational Simulations. *J Med Chem* [Internet]. 2017;acs.jmedchem.6b01453.
20. Jr KL. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Recept Channels.* 1994;2(1):1–7.
21. Wang HY, Malbon CC. Wnt-frizzled signaling to G-protein-coupled effectors. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61(1):69–75.
22. Katritch V, Cherezov V, Stevens RC. Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. *Annu Rev ...* [Internet]. 2013;53(7):531–56.
23. Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin L-G, Schiöth HB. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol.* 2003;63(6):1256–72.
24. Bortolato A, Doré AS, Hollenstein K, Tehan BG, Mason JS, Marshall FH. Structure of Class B GPCRs: New horizons for drug discovery. *Br J Pharmacol.* 2014;171(13):3132–45.
25. Pal K, Melcher K, Xu HE. Structure and mechanism for recognition of peptide hormones by Class B G-protein-coupled receptors. *Acta Pharmacol Sin* [Internet]. 2012;33(3):300–311.
26. Ulrich CD, Holtmann M, Miller LJ. Secretin and vasoactive intestinal peptide receptors: Members of a unique family of G protein-coupled receptors. *Gastroenterology.* 1998;114(2):382–97.
27. Munk C, Isberg V, Mordalski S, Harpsøe K, Rataj K, Hauser AS, et al. GPCRdb: the G protein-coupled receptor database ??? an introduction. *Br J Pharmacol.* 2016;16:2195–207.
28. Nørskov-Lauritsen L, Bräuner-Osborne H. Role of post-translational modifications on structure, function and pharmacology of class C G protein-coupled receptors. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2015;763:233–40.
29. Wellendorph P, Bräuner-Osborne H. Molecular cloning, expression, and sequence analysis of GPRC6A, a novel family C G-protein-coupled receptor. *Gene.* 2004;335(1–2):37–46.
30. Klein PS, Sun TJ, Saxe CL 3rd, Kimmel AR, Johnson RL, Devreotes PN. A chemoattractant

- receptor controls development in Dictyostelium discoideum. *Science*. 1988;241(4872):1467–72.
31. Neer EJ. Heterotrimeric G proteins: Organizers of transmembrane signals. *Cell*. 1995;80(2):249–57.
 32. Hurowitz EH, Melnyk JM, Chen Y, Kouros-mehr H, Simon MI. Genomic Characterization of the Human Heterotrimeric G Protein α_3 and α_7 Subunit Genes. *Screening*. 2000;120:111–20.
 33. Carty DJ, Iyengar R, Hildebrandt D. Distinct Guanine Nucleotide Three Gi Proteins * Binding. 1990;265(11):6268–73.
 34. Hamm WM & HE. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2008;9(1):60–71.
 35. Viktoriya Syrovatkina, Kamela O. Alegre, Raja Dey and X-YH. Regulation, Signaling and Physiological Functions of G-proteins. *J Mol Biol*. 2016;428(19):3850–3868.
 36. Cabrera-Vera TM, Vanhauwe J, Thomas TO, Medkova M, Preininger A, Mazzoni MR, et al. Insights into G Protein Structure, Function, and Regulation. *Endocr Rev*. 2003;24(6):765–81.
 37. Serezani CH, Ballinger MN, Aronoff DM, Peters-Golden M. Cyclic AMP: Master regulator of innate immune cell function. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2008;39(2):127–32.
 38. Litosch I. Regulation of phospholipase C- β 1 GTPase-activating protein (GAP) function and relationship to Gq efficacy. *IUBMB Life*. 2013;65(11):936–40.
 39. Crespo P, Xu N, Simonds WF, Gutkind JS. Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits. *Nature*. 1994;369(6479):418–20.
 40. Wetzker R, Böhmer F-D. Transactivation joins multiple tracks to the ERK/MAPK cascade. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(8):651–7.
 41. Crespo P. La ruta RAS-ERK como diana antitumoral. *Redes señalización y estrategias Ter* [Internet]. 2009;123–37.
 42. Wetzker R, Böhmer FD. Transactivation joins multiple tracks to the ERK/MAPK cascade. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(8):651–7.
 43. Hausdorff WP, Caron MG LR. Turning off the signal: desensitization of beta-adrenergic receptor function. *FASEB J* [Internet]. 1990;4(11):2881–9.
 44. Premont RT, Gainetdinov RR. Physiological Roles of G Protein–Coupled Receptor Kinases and Arrestins. *Annu Rev Physiol* [Internet]. 2007;69:511–34.
 45. Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ. beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* (80-) [Internet]. 1990;248(4962):1547–50.
 46. Reiter E, Ayoub MA, Pellissier LP, Landomiel F, Musnier A, Tréfier A, et al. β -arrestin signalling and bias in hormone-responsive GPCRs. *Mol Cell Endocrinol*. 2017;449:28–41.

47. Williams JT, Christie MJ, Manzoni O. Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiol Rev* [Internet]. 2001;81(1):299–343.
48. Krasel C, Bünemann M, Lorenz K, Lohse MJ. B-Arrestin Binding To the B2-Adrenergic Receptor Requires Both Receptor Phosphorylation and Receptor Activation. *J Biol Chem*. 2005;280(10):9528–35.
49. Lefkowitz RJ. R EVIEW Transduction of Receptor Signals. *Science* (80-). 2005;512(2005):512–8.
50. Luttrell LM, Roudabush FL, Choy EW, Miller WE, Field ME, Pierce KL, et al. Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2001;98(5):2449–54.
51. Kumari P, Srivastava A, Banerjee R, Ghosh E, Gupta P, Ranjan R, et al. Functional competence of a partially engaged GPCR– β -arrestin complex. *Nat Commun* [Internet]. 2016;7:13416.
52. Reiter E, Ayoub MA, Pellissier LP, Landomiel F, Musnier A, Tréfier A, et al. β -arrestin signalling and bias in hormone-responsive GPCRs. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2017;449:28–41.
53. Park PS, Lodowski DT, Palczewski K. Activation of G Protein–Coupled Receptors: Beyond Two-State Models and Tertiary Conformational Changes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2009;48(3):107–141.
54. Leff P. The two-state model of receptor activation. *Trends Pharmacol Sci*. 1995;16(3):89–97.
55. Martí-Solano M, Schmidt D, Kolb P, Selent J. Drugging specific conformational states of GPCRs: Challenges and opportunities for computational chemistry. *Drug Discov Today*. 2016;21(4):625–31.
56. Seifert R, Wenzel-Seifert K. Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2002;366:381–416.
57. Roth BL. DREADDs for Neuroscientists. *Neuron* [Internet]. 2016;89(4):683–94.
58. Wacker D, Stevens RC, Roth BL. How Ligands Illuminate GPCR Molecular Pharmacology. *Cell* [Internet]. 2017;170(3):414–27.
59. Fronik P, Gaiser BI, Sejer Pedersen D. Bitopic Ligands and Metastable Binding Sites: Opportunities for G Protein-Coupled Receptor (GPCR) Medicinal Chemistry. *J Med Chem*. 2017;60(10):4126–34.
60. Rankovic Z, Brust TF, Bohn LM. Biased agonism: An emerging paradigm in GPCR drug discovery. *Bioorganic Med Chem Lett* [Internet]. 2016;26(2):241–50.
61. Urban JD, Clarke WP, von Zastrow M, Nichols DE, Kobilka B, Weinstein H, et al. Functional Selectivity and Classical Concepts of Quantitative Pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. 2007;320(1):1–13.

62. Kahsai AW, Xiao K, Rajagopal S, Ahn S, Arun K. Multiple ligand-specific conformations of the β_2 -adrenergic receptor. *Nat Chem Biol*. 2012;7(10):692–700.
63. Wisler JW, Xiao K, Thomsen ARB, Lefkowitz RJ. Recent developments in biased agonism. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 2014;27(1):18–24.
64. Zoran Rankovica,*, Tarsis F. Brustb, and Laura M. Bohnb aDiscovery. Biased agonism: An emerging paradigm in GPCR drug discovery. 2016;26(2):241–250.
65. Maurice P, Kamal M, Jockers R. Asymmetry of GPCR oligomers supports their functional relevance. *Trends Pharmacol Sci* [Internet]. 2011;32(9):514–20.
66. Angers S, Salahpour A, Bouvier M. Biochemical and biophysical demonstration of GPCR oligomerization in mammalian cells. *Life Sci*. 2001;68(19–20):2243–50.
67. Salahpour A, Angers S, Bouvier M. Functional significance of oligomerization of G-protein-coupled receptors. *Trends Endocrinol Metab*. 2000;11(5):163–8.
68. Balenga NA, Martínez-Pinilla E, Kargl J, Schröder R, Peinhaupt M, Platzer W, et al. Heteromerization of GPR55 and cannabinoid CB2 receptors modulates signalling. *Br J Pharmacol*. 2014;171(23):5387–406.
69. Lambert NA, Javitch JA. CrossTalk opposing view: Weighing the evidence for class A GPCR dimers, the jury is still out. *J Physiol* [Internet]. 2014;592(12):2443–5.
70. Limbird LEE, Lefkowitz RJ. Negative Cooperativity among α & Adrenergic Erythrocyte Membranes *. *J Biol Chem*. 1976;251(25):5007–14.
71. Conn PM, Rogers DC, Stewart JM, Nidel J ST. Conversion of a gonadotropin-releasing hormone antagonist to an agonist. *Nature* [Internet]. 1982;296(5858):653–5.
72. Heldin C-H. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* [Internet]. 1995;80(2):213–23.
73. Romano C, Yang WL, O’Malley KL. Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer. *J Biol Chem* [Internet]. 1996;271(45):28612–6.
74. Maggio R, Vogel Z, Wess J. Coexpression studies with mutant muscarinic/adrenergic receptors provide evidence for intermolecular “cross-talk” between G-protein-linked receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1993;90(7):3103–7.
75. Borroto-Escuela D, Brito I, Palma M, Jiménez-Beristain A, Narváez M, Corrales F, et al. On the Role of the Balance of GPCR Homo/ Heteroreceptor Complexes in the Brain. *J Adv Neurosci Res* [Internet]. 2015;2(1):36–44.
76. Kasai RS, Kusumi A. Single-molecule imaging revealed dynamic GPCR dimerization. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 2014;27(1):78–86.
77. Nivedita Mitra^{1,†}, Yuting Liu^{1,†}, Jian Liu¹, Eugene Serebryany¹, Victoria Mooney¹ BT, DeVree², Roger K. Sunahara² and ECYY. Calcium Dependent Ligand Binding and G-protein Signaling of Family B GPCR Parathyroid Hormone 1 Receptor Purified in Nanodiscs. *ACS Chem Biol*. 2013;8(3):617–25.

78. Banères JL, Parello J. Structure-based analysis of GPCR function: Evidence for a novel pentameric assembly between the dimeric leukotriene B4 receptor BLT1 and the G-protein. *J Mol Biol.* 2003;329(4):815–29.
79. Galvez T, Duthey B, Kniazeff J, Blahos J, Rovelli G, Bettler B, et al. Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABAB receptor function. *EMBO J.* 2001;20(9):2152–9.
80. Milligan G. G protein-coupled receptor hetero-dimerization: Contribution to pharmacology and function. *Br J Pharmacol.* 2009;158(1):5–14.
81. Fung JJ, Deupi X, Pardo L, Yao XJ, Velez-Ruiz G a, Devree BT, et al. Ligand-regulated oligomerization of beta(2)-adrenoceptors in a model lipid bilayer. *EMBO J [Internet].* 2009;28(21):3315–28.
82. Palczewski K. Oligomeric forms of G protein-coupled receptors (GPCRs). *Trends Biochem Sci.* 2010;35(11):595–600.
83. Prezeau L, Rives ML, Comps-Agrar L, Maurel D, Kniazeff J, Pin JP. Functional crosstalk between GPCRs: with or without oligomerization. *Curr Opin Pharmacol.* 2010;10(1):6–13.
84. Lee SP, O’Dowd BF, Ng GY, Varghese G, Akil H, Mansour a, et al. Inhibition of cell surface expression by mutant receptors demonstrates that D2 dopamine receptors exist as oligomers in the cell. *Mol Pharmacol.* 2000;58(1):120–8.
85. Hern J a, Baig AH, Mashanov GI, Birdsall B, Corrie JET, Lazareno S, et al. Formation and dissociation of M1 muscarinic receptor dimers seen by total internal reflection fluorescence imaging of single molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A [Internet].* 2010;107(6):2693–8.
86. Sengupta D, Chattopadhyay A. Molecular dynamics simulations of GPCR-cholesterol interaction: An emerging paradigm. *Biochim Biophys Acta - Biomembr [Internet].* 2015;1848(9):1775–82.
87. Killian JA. Hydrophobic mismatch between proteins and lipids in membranes. *Biochim Biophys Acta - Rev Biomembr.* 1998;1376(3):401–15.
88. Botelho AV, Huber T, Sakmar TP, Brown MF. Curvature and Hydrophobic Forces Drive Oligomerization and Modulate Activity of Rhodopsin in Membranes. *Biophys J [Internet].* 2006;91(12):4464–77.
89. Tsuji Y, Shimada Y, Takeshita T, Kajimura N, Nomura S, Sekiyama N, et al. Cryptic dimer interface and domain organization of the extracellular region of metabotropic glutamate receptor subtype 1. *J Biol Chem.* 2000;275(36):28144–51.
90. Zhang Z, Sun S, Quinn SJ, Brown EM, Bai M. The Extracellular Calcium-sensing Receptor Dimerizes through Multiple Types of Intermolecular Interactions. *J Biol Chem.* 2001;276(7):5316–22.
91. Romano C, Miller JK, Hyrc K, Dikranian S, Mennerick S, Takeuchi Y, et al. Covalent and noncovalent interactions mediate metabotropic glutamate receptor mGlu5 dimerization. *Mol Pharmacol [Internet].* 2001;59(1):46–53.

92. Hebert TE, Moffett S, Morello JP, Loisel TP, Bichet DG, Barret C, et al. A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J Biol Chem*. 1996;271(27):16384–92.
93. Ng GY, O’Dowd BF, Lee SP, Chung HT, Brann MR, Seeman P, et al. Dopamine D2 receptor dimers and receptor-blocking peptides. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1996;227(1):200–4.
94. Łukasiewicz S, Faron-Górecka A, Dobrucki J, Polit A, Dziedzicka-Wasylewska M. Studies on the role of the receptor protein motifs possibly involved in electrostatic interactions on the dopamine D1 and D2 receptor oligomerization. *FEBS J*. 2009;276(3):760–75.
95. White JH, Wise A, Main MJ, Green A, Fraser NJ, Disney GH, et al. Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. 1998;396(6712):679–82.
96. Cvejic S, Devi L a. Dimerization of the μ Opioid Receptor : October. 1997;272(43):26959–64.
97. Baltoumas FA, Theodoropoulou MC, Hamodrakas SJ. Molecular dynamics simulations and structure-based network analysis reveal structural and functional aspects of G-protein coupled receptor dimer interactions. *J Comput Aided Mol Des*. 2016;30(6):489–512.
98. Simpson LM, Taddese B, Wall ID, Reynolds CA. Bioinformatics and molecular modelling approaches to GPCR oligomerization. *Curr Opin Pharmacol*. 2010;10(1):30–7.
99. Filizola M, Weinstein H. The study of G-protein coupled receptor oligomerization with computational modeling and bioinformatics. *FEBS J*. 2005;272(12):2926–38.
100. S. F, V. C, L.A. D, M. F, R. J, M.J. L, et al. G protein-coupled receptor oligomerization revisited: functional and pharmacological perspectives. *Pharmacol Rev* [Internet]. 2014;66(2):413–34.
101. Daniell H. The G protein-coupled receptor rhodopsin in the native membrane. *FEBS Lett*. 2012;76(October 2009):211–20.
102. Cordoní A, Navarro G, Aymerich MS, Franco R. Structures for G-Protein-Coupled Receptor Tetramers in Complex with G Proteins. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2015;40(10):548–51.
103. Avissar S, Amitai G, Sokolovsky M. Oligomeric structure of muscarinic receptors is shown by photoaffinity labeling: subunit assembly may explain high- and low-affinity agonist states. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1983;80(1):156–9.
104. Iyengar R, Herberg JT, Rich KA. Characterization of the hepatic glucagon receptor. *J Recept Res* [Internet]. 1984;4(1–6):247–65.
105. Zawarynski P, Tallerico T, Seeman P, Lee SP, O’Dowd BF, George SR. Dopamine D2 receptor dimers in human and rat brain. *FEBS Lett* [Internet]. 1998;441:383–6.
106. Skieterska K, Duchou J, Lintermans B, Van Craenenbroeck K. Detection of G Protein-Coupled Receptor (GPCR) Dimerization by Coimmunoprecipitation. *Methods Cell Biol*. 2013;117:323–40.

107. Milligan G, Ramsay D, Pascal G, Carrillo JJ. GPCR dimerisation. *Life Sci.* 2003;74(2–3):181–8.
108. Cvejic S, Devi L a. Dimerization of the δ Opioid Receptor : October. 1997;272(43):26959–64.
109. Jordan, Trapaidze, Gomes, Nivarthi, Devi. Oligomerization of opioid receptors with beta 2-adrenergic receptors: a role in trafficking and mitogen-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2001;98(1):343–8.
110. Ginés S, Hillion J, Torvinen M, Le Crom S, Casadó V, Canela EI, et al. Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2000;97(15):8606–11.
111. Gama L, Wilt SG, Breitwieser GE. Heterodimerization of Calcium Sensing Receptors with Metabotropic Glutamate Receptors in Neurons. *J Biol Chem.* 2001;276(42):39053–9.
112. Yoshioka K, Saitoh O, Nakata H. Agonist-promoted heteromeric oligomerization between adenosine A1 and P2Y1 receptors in living cells. *FEBS Lett.* 2002;523(1–3):147–51.
113. Forster T. Energiewanderung und Fluoreszenz. *Naturwissenschaften.* 1946;33(6):166–75.
114. Overton MC, Blumer KJ. G-protein-coupled receptors function as oligomers in vivo. *Curr Biol.* 2000;10(6):341–4.
115. Tsien RY. The green fluorescent. *Annu Rev Biochem* [Internet]. 1998;67(11):509–44.
116. Pollok BA, Heim R. Using GFP in FRET-based applications. *Trends Cell Biol.* 1999;9(2):57–60.
117. Angers S. Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2000;97(7):3684–9.
118. McVey M, Ramsay D, Kellett E, Rees S, Wilson S, Pope AJ, et al. Monitoring receptor oligomerization using time-resolved fluorescence resonance energy transfer and bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem.* 2001;276(17):14092–9.
119. Kroeger KM, Hanyaloglu AC, Seeber RM, Miles LEC, Eidne KA. Constitutive and agonist-dependent homo-oligomerization of the thyrotropin-releasing hormone receptor. Detection in living cells using bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem.* 2001;276(16):12736–43.
120. Ayoub MA, Couturier C, Lucas-Meunier E, Angers S, Fossier P, Bouvier M, et al. Monitoring of ligand-independent dimerization and ligand-induced conformational changes of melatonin receptors in living cells by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem.* 2002;277(24):21522–8.
121. Mercier JF, Salahpour A, Angers S, Breit A, Bouvier M. Quantitative assessment of β 1- and β 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem.* 2002;277(47):44925–31.

122. Wilson S, Wilkinson G, Milligan G. The CXCR1 and CXCR2 receptors form constitutive homo- and heterodimers selectively and with equal apparent affinities. *J Biol Chem*. 2005;280(31):28663–74.
123. Borroto-Escuela DO, Romero-Fernandez W, Tarakanov AO, Marcellino D, Ciruela F, Agnati LF, et al. Dopamine D2 and 5-hydroxytryptamine 5-HT_{2A} receptors assemble into functionally interacting heteromers. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2010;401(4):605–10.
124. Borroto-Escuela DO, Craenenbroeck K Van, Romero-Fernandez W, Guidolin D, Woods AS, Rivera A, et al. Dopamine D2 and D4 receptor heteromerization and its allosteric receptor-receptor interactions. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2011;404(4):928–34.
125. J.Linder BRBCRMPTLS. Sequential bioluminescence resonance energy transfer–fluorescence resonance energy transfer-based ratiometric protease assays with fusion proteins of firefly luciferase and red fluorescent protein. *Anal Biochem*. 2011;414(2):239–45.
126. Vidi PA, Ejendal KFK, Przybyla JA, Watts VJ. Fluorescent protein complementation assays: New tools to study G protein-coupled receptor oligomerization and GPCR-mediated signaling. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2011;331(2):185–93.
127. Vilardaga J-P, Nikolaev VO, Lorenz K, Ferrandon S, Zhuang Z, Lohse MJ. Conformational cross-talk between alpha_{2A}-adrenergic and mu-opioid receptors controls cell signaling. *Nat Chem Biol*. 2008;4(2):126–31.
128. Gandia J, Galino J, Amaral OB, Soriano A, Lluís C, Franco R, et al. Detection of higher-order G protein-coupled receptor oligomers by a combined BRET-BiFC technique. *FEBS Lett*. 2008;582(20):2979–84.
129. Guo W, Urizar E, Kralikova M, Mobarec JC, Shi L, Filizola M, et al. Dopamine D2 receptors form higher order oligomers at physiological expression levels. *EMBO J*. 2008;27(17):2293–304.
130. Rebois RV, Robitaille M, Pétrin D, Zylbergold P, Trieu P, Hébert TE. Combining protein complementation assays with resonance energy transfer to detect multipartner protein complexes in living cells. *Methods*. 2008;45(3):214–8.
131. Hu CD, Kerppola TK. Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2003;21(5):539–45.
132. Fredriksson S, Gullberg M, Jarvius J, Olsson C, Pietras K, Gústafsdóttir SM, et al. Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays. *Nat Biotechnol*. 2002;20(5):473–7.
133. Devi LA. Heterodimerization of G-protein-coupled receptors: Pharmacology, signaling and trafficking. *Trends Pharmacol Sci*. 2001;22(10):532–7.
134. AbdAlla S, Lothar H, Abdel-tawab AM, Quitterer U. The Angiotensin II AT₂ Receptor Is an AT₁ Receptor Antagonist. *J Biol Chem*. 2001;276(43):39721–6.

135. Hillion J, Canals M, Torvinen M, Casadó V, Scott R, Terasmaa A, et al. Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors. *J Biol Chem*. 2002;277(20):18091–7.
136. Lavoie C, Mercier JF, Salahpour A, Umapathy D, Breit A, Villeneuve LR, et al. β 1/ β 2-adrenergic receptor heterodimerization regulates β 2-adrenergic receptor internalization and ERK signaling efficacy. *J Biol Chem*. 2002;277(38):35402–10.
137. Filippov AK, Connolly CN, Bettler B, Brown D a, Moss SJ. Intracellular Retention of Recombinant GABA B Receptors *. 1998;273(41):26361–7.
138. Margeta-Mitrovic M, Jan YN, Jan LY. A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron*. 2000;27(1):97–106.
139. Terrillon S, Durroux T, Mouillac B, Breit A, Ayoub MA, Taulan M, et al. Oxytocin and vasopressin V1a and V2 receptors form constitutive homo- and heterodimers during biosynthesis. *Mol Endocrinol [Internet]*. 2003;17(4):677–91.
140. Karpa KD, Lin R, Kabbani N, Levenson R. The dopamine D3 receptor interacts with itself and the truncated D3 splice variant d3nf: D3-D3nf interaction causes mislocalization of D3 receptors. *Mol Pharmacol [Internet]*. 2000;58(4):677–83.
141. Infection CH-, Benkirane M, Jin D, Rene F, Koup RA, Jeang K, et al. Mechanism of Transdominant Inhibition of CCR5-mediated HIV-1 Infection by ccr5 Δ 32*. *J Biol Chem*. 1997;272(5):1–5.
142. Laroche G, Lépine MC, Thériault C, Giguère P, Giguère V, Gallant MA, et al. Oligomerization of the α and β isoforms of the thromboxane A2 receptor: Relevance to receptor signaling and endocytosis. *Cell Signal*. 2005;17(11):1373–83.
143. Devi BAJ and LA. G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature*. 1999;399(6737):697–700.
144. Mellado M, Rodríguez-Frade JM, Vila-Coro AJ, Fernández S, De Ana AM, Jones DR, et al. Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways. *EMBO J*. 2001;20(10):2497–507.
145. Maggio R, Barbier P, Colelli A, Salvadori F, Demontis G, Corsini GU. G protein-linked receptors: pharmacological evidence for the formation of heterodimers. *J Pharmacol Exp Ther [Internet]*. 1999;291(1):251–7.
146. Hilairet S, Bouaboula M, Carrière D, Le Fur G, Casellas P. Hypersensitization of the orexin 1 receptor by the CB1 receptor: Evidence for cross-talk blocked by the specific CB1 antagonist, SR141716. *J Biol Chem*. 2003;278(26):23731–7.
147. Ellis J, Pediani JD, Canals M, Milasta S, Milligan G. Orexin-1 receptor-cannabinoid CB1 receptor heterodimerization results in both ligand-dependent and -independent coordinated alterations of receptor localization and function. *J Biol Chem*. 2006;281(50):38812–24.
148. Kern A, Albarran-zeckler R, Walsh HE, Smith RG. Apo-ghrelin receptor forms heteromers with DRD2 in hypothalamic neurons and is essential for anorexigenic effects of DRD2 agonism. *Neuron*. 2012;73(2):317–32.

149. Durroux T. Principles: A model for the allosteric interactions between ligand binding sites within a dimeric GPCR. *Trends Pharmacol Sci.* 2005;26(7):376–84.
150. Lambert NA, Javitch JA. CrossTalk opposing view: Weighing the evidence for class A GPCR dimers, the jury is still out. *J Physiol.* 2014;592(12):2443–5.
151. Franco R, Martínez-Pinilla E, Lanciego JL, Navarro G. Basic pharmacological and structural evidence for class A G-protein-coupled receptor heteromerization. *Front Pharmacol.* 2016;7(MAR):1–10.
152. Abdalla S, Lothar H, Quitterer U. AT 1 -receptor heterodimers show enhanced G-protein activation. 2000;407(September):94–9.
153. Kearn CS. Concurrent Stimulation of Cannabinoid CB1 and Dopamine D2 Receptors Enhances Heterodimer Formation: A Mechanism for Receptor Cross-Talk? *Mol Pharmacol [Internet].* 2005;67(5):1697–704.
154. Hasbi A, Perreault ML, Shen MYF, Zhang L, To R, Fan T, et al. A peptide targeting an interaction interface disrupts the dopamine D1-D2 receptor heteromer to block signaling and function in vitro and in vivo: Effective selective antagonism. *FASEB J.* 2014;28(11):4806–20.
155. Casadó V, Cortés A, Mallol J, Pérez-Capote K, Ferré S, Lluís C, et al. GPCR homomers and heteromers: A better choice as targets for drug development than GPCR monomers? *Pharmacol Ther [Internet].* 2009;124(2):248–57.
156. ElSohly MA, Slade D. Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sci.* 2005;78(5):539–48.
157. Russo EB. History of cannabis and its preparations in saga, science, and sobriquet. *Chem Biodivers.* 2007;4(8):1614–48.
158. Gaoni Y, Mechoulam R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J Am Chem Soc [Internet].* 1964;86:1646–7.
159. Devane WA, Dysarz FA, Johnson RM, Melvin S, Howlett C. Determination Rat Brain and Characterization of a Cannabinoid Receptor in. *Mol Pharmacol.* 1988;34(5):605–13.
160. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature.* 1990;346(6284):561–4.
161. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science [Internet].* 1992;258(5090):1946–9.
162. Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, et al. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature.* 1994;372(6507):686–91.
163. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature.* 1993;365(6441):61–5.
164. Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, et al. 2-

- Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain [Internet]. Vol. 215, *Biochem Biophys Res Commun*. 1995. p. 89–97.
165. Mátyás F, Urbán GM, Watanabe M, Mackie K, Zimmer A, Freund TF, et al. Identification of the sites of 2-arachidonoylglycerol synthesis and action imply retrograde endocannabinoid signaling at both GABAergic and glutamatergic synapses in the ventral tegmental area. *Neuropharmacology*. 2008;54(1):95–107.
 166. Schicho R, Storr M. IBD patients find symptom relief in the Cannabis field. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2014;11(3):142–3.
 167. Felder CC, Nielsen A, Briley EM, Palkovits M, Priller J, Axelrod J, et al. Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett* [Internet]. 1996;393(2–3):231–5.
 168. Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N. Molecular Characterization of a Phospholipase D Generating Anandamide and Its Congeners. *J Biol Chem*. 2004;279(7):5298–305.
 169. Simon GM, Cravatt BF. Endocannabinoid biosynthesis proceeding through glycerophospho-N-acyl ethanolamine and a role for α,β -hydrolase 4 in this pathway. *J Biol Chem*. 2006;281(36):26465–72.
 170. Liu J, Wang L, Harvey-White J, Osei-Hyiaman D, Razdan R, Gong Q, et al. A biosynthetic pathway for anandamide. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2006;103(36):13345–50.
 171. Deustch, D.G., N. UEDA SY. The fatty acid amide hydrolase (FAAH). *PLEFA* [Internet]. 2002;66(2–3):201–10.
 172. Hermanson DJ, Marnett LJ. Cannabinoids, endocannabinoids, and cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2011;30(3–4):599–612.
 173. Bisogno T, Berrendero F, Ambrosino G, Cebeira M, Ramos JA, Fernandez-Ruiz JJ, et al. Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1999;256(2):377–80.
 174. Basavarajappa BS. Critical enzymes involved in endocannabinoid metabolism. *Protein Pept Lett*. 2007;14(3):237–46.
 175. Basavarajappa BS, Saito M, Cooper TB, Hungund BL. Chronic ethanol inhibits the anandamide transport and increases extracellular anandamide levels in cerebellar granule neurons. *Eur J Pharmacol*. 2003;466(1–2):73–83.
 176. Konrad RJ, Major CD, Wolf BA. Diacylglycerol hydrolysis to arachidonic acid is necessary for insulin secretion from isolated pancreatic islets: Sequential actions of diacylglycerol and monoacylglycerol lipases. *Biochemistry*. 1994;33(45):13284–94.
 177. Di Marzo V, Bisogno T, Sugiura T, Melck D, De Petrocellis L. The novel endogenous cannabinoid 2-arachidonoylglycerol is inactivated by neuronal- and basophil-like cells - connections with anandamide. *Biochem J* [Internet]. 1998;331:15–9.
 178. Marisol S. Castaneto^{1, 2}, David A. Gorelick³, Nathalie A. Desrosiers^{1, 2} RL, Hartman^{1, 2}, Sandrine Pirard¹, and Marilyn A. Huestis¹ *. *Synthetic Cannabinoids: Epidemiology,*

- Pharmacodynamics, and Clinical Implications. *Drug Alcohol Depend.* 2014;(0):12–41.
179. Lu Y, Anderson HD. Cannabinoid signaling in health and disease. *Can J Physiol Pharmacol* [Internet]. 2017;95(4):311–27.
 180. Correa F, Docagne F, Mestre L, Clemente D, Hernangómez M, Loria F, et al. A role for CB2 receptors in anandamide signalling pathways involved in the regulation of IL-12 and IL-23 in microglial cells. *Biochem Pharmacol.* 2009;77(1):86–100.
 181. Ramirez BG. Prevention of Alzheimer’s Disease Pathology by Cannabinoids: Neuroprotection Mediated by Blockade of Microglial Activation. *J Neurosci* [Internet]. 2005;25(8):1904–13.
 182. Kelsey JE, Harris O, Cassin J. The CB1 antagonist rimonabant is adjunctively therapeutic as well as monotherapeutic in an animal model of Parkinson’s disease. *Behav Brain Res.* 2009;203(2):304–7.
 183. Laprairie RB, Kelly MEM, Denovan-Wright EM. Cannabinoids increase type 1 cannabinoid receptor expression in a cell culture model of striatal neurons: Implications for Huntington’s disease. *Neuropharmacology* [Internet]. 2013;72:47–57.
 184. Sagredo O, González S, Aroyo I, Pazos MR, Benito C, Lastres-Becker I, et al. Cannabinoid CB2 receptor agonists protect the striatum against malonate toxicity: Relevance for Huntington’s disease. *Glia.* 2009;57(11):1154–67.
 185. Verty AN a, Allen AM, Oldfield BJ. The effects of rimonabant on brown adipose tissue in rat: implications for energy expenditure. *Obesity (Silver Spring).* 2009;17(2):254–61.
 186. Hsiao WC, Shia KS, Wang YT, Yeh YN, Chang CP, Lin Y, et al. A novel peripheral cannabinoid receptor 1 antagonist, BPR0912, reduces weight independently of food intake and modulates thermogenesis. *Diabetes, Obes Metab.* 2015;17(5):495–504.
 187. Verty ANA, Stefanidis A, McAinch AJ, Hryciw DH, Oldfield B. Anti-obesity effect of the CB2 receptor agonist JWH-015 in diet-induced obese mice. *PLoS One.* 2015;10(11):1–19.
 188. Krishnan G, Chatterjee N. Endocannabinoids alleviate proinflammatory conditions by modulating innate immune response in muller glia during inflammation. *Glia.* 2012;60(11):1629–45.
 189. Gui H, Tong Q, Qu W, Mao CM, Dai SM. The endocannabinoid system and its therapeutic implications in rheumatoid arthritis. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2015;26(1):86–91.
 190. Liao F, Xu H, Torrey N, Road P, Jolla L. Activation of the Cannabinoid 2 Receptor (CB2) Protects Against Experimental Colitis. 2015;2(74):1678–85.
 191. Chung SC, Hammarsten P, Josefsson A, Stattin P, Granfors T, Egevad L, et al. A high cannabinoid CB1 receptor immunoreactivity is associated with disease severity and outcome in prostate cancer. *Eur J Cancer.* 2009;45(1):174–82.
 192. Orellana-Serradell O, Poblete CE, Sanchez C, Castellón EA, Gallegos I, Huidobro C, et al. Proapoptotic effect of endocannabinoids in prostate cancer cells. *Oncol Rep.* 2015;33(4):1599–608.

193. Eljaschewitsch E, Witting A, Mawrin C, Lee T, Schmidt PM, Wolf S, et al. The endocannabinoid anandamide protects neurons during CNS inflammation by induction of MKP-1 in microglial cells. *Neuron*. 2006;49(1):67–79.
194. Hu DL, Zhu G, Mori F, Omoe K, Okada M, Wakabayashi K, et al. Staphylococcal enterotoxin induces emesis through increasing serotonin release in intestine and it is downregulated by cannabinoid receptor 1. *Cell Microbiol*. 2007;9(9):2267–77.
195. Walker JM, Huang SM, Strangman NM, Tsou K, Sañudo-Peña MC. Pain modulation by release of the endogenous cannabinoid anandamide. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1999;96(21):12198–203.
196. Clapper JR, Moreno-sanz G, Russo R, Guijarro A, Duranti A, Tontini A, et al. Anandamide suppresses pain initiation through a peripheral endocannabinoid mechanism. 2012;13(10):1265–70.
197. Lake KD, Compton DR, Varga K, Martin BR, Kunos G. Cannabinoid-induced hypotension and bradycardia in rats mediated by CB1-like cannabinoid receptors. *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. 1997;281(3):1030–7.
198. Chalovich JM, Eisenberg E. NIH Public Access. *Biophys Chem*. 2012;257(5):2432–7.
199. Bilfinger T V, Salzet M, Fimiani C, Deutsch DG, Tramu G, Stefano GB. Pharmacological evidence for anandamide amidase in human cardiac and vascular tissues. *Int J Cardiol*. 1998;64 Suppl 1:S15-22.
200. Steffens S, Veillard NR, Arnaud C, Pelli G, Burger F, Staub C, et al. Low dose oral cannabinoid therapy reduces progression of atherosclerosis in mice. *Nature*. 2005;434(7034):782–6.
201. Jiang LS, Pu J, Han ZH, Hu LH, He B. Role of activated endocannabinoid system in regulation of cellular cholesterol metabolism in macrophages. *Cardiovasc Res*. 2009;81(4):805–13.
202. Giovanni Bénard, Federico Massa, Nagore Puente, Joana Lourenço, Luigi Bellocchio, Edgar Soria-Gómez, Isabel Matias, Anna Delamarre, Mathilde Metna-Laurent, Astrid Cannich, Etienne Hebert-Chatelain, Christophe Mulle, Silvia Ortega-Gutiérrez, Mar Martín-Fon RR& GM. Mitochondrial CB1 receptors regulate neuronal energy metabolism. *Nat Neurosci* [Internet]. 2012;15(4):558–564.
203. Fišar Z, Singh N, Hroudová J. Cannabinoid-induced changes in respiration of brain mitochondria. *Toxicol Lett*. 2014;231(1):62–71.
204. Vijayakumar RS, Lin Y, Shia K, Yeh Y, Hsieh W, Hsiao W, et al. Induction of fatty acid oxidation resists weight gain , ameliorates hepatic steatosis and reduces cardiometabolic risk factors. *Int J Obes* [Internet]. 2012;36(7):999–1006.
205. Li Q, Wang F, Zhang YM, Zhou JJ, Zhang Y. Activation of cannabinoid type 2 receptor by JWH133 protects heart against ischemia/reperfusion-induced apoptosis. *Cell Physiol Biochem*. 2013;31(4–5):693–702.
206. Rubino T, Guidali C, Vigano D, Realini N, Valenti M, Massi P, et al. CB1 receptor stimulation in specific brain areas differently modulate anxiety-related behaviour.

- Neuropharmacology. 2008;54(1):151–60.
207. Christensen R, Kristensen PK, Bartels EM, Bliddal H, Astrup A. Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: a meta-analysis of randomised trials. *Lancet*. 2007;370(9600):1706–13.
 208. Méndez-Díaz M, Caynas-Rojas S, Arteaga Santacruz V, Ruiz-Contreras AE, Aguilar-Roblero R, Prospéro-García O. Entopeduncular nucleus endocannabinoid system modulates sleep-waking cycle and mood in rats. *Pharmacol Biochem Behav* [Internet]. 2013;107:29–35.
 209. Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, et al. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of Cannabinoid Receptors. *Pharmacol Rev*. 2002;54(2):161–202.
 210. Bonz A, Laser M, Küllmer S, Kniesch S, Babin-Ebell J, Popp V, et al. Cannabinoids acting on CB1 receptors decrease contractile performance in human atrial muscle. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2003;41(4):657–64.
 211. Shen M, Piser TM, Seybold VS, Thayer S a. Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. *J Neurosci* [Internet]. 1996;16(14):4322–34.
 212. Vaughan CW, McGregor IS, Christie MJ. Cannabinoid receptor activation inhibits GABAergic neurotransmission in rostral ventromedial medulla neurons in vitro. *Br J Pharmacol* [Internet]. 1999;127(4):935–40.
 213. Kim DJ, Thayer SA. Activation of CB1 cannabinoid receptors inhibits neurotransmitter release from identified synaptic sites in rat hippocampal cultures. *Brain Res*. 2000;852(2):398–405.
 214. Houston DB, Howlett AC. Differential receptor-G-protein coupling evoked by dissimilar cannabinoid receptor agonists. *Cell Signal*. 1998;10(9):667–74.
 215. Mukhopadhyay S, McIntosh HH, Houston DB, Howlett AC. The CB(1) cannabinoid receptor juxtamembrane C-terminal peptide confers activation to specific G proteins in brain. *Mol Pharmacol* [Internet]. 2000;57(1):162–70.
 216. Howlett a C, Song C, Berglund B a, Wilken GH, Pigg JJ. Characterization of CB1 cannabinoid receptors using receptor peptide fragments and site-directed antibodies. *Mol Pharmacol*. 1998;53(3):504–10.
 217. Mukhopadhyay S, Cowsik SM, Lynn AM, Welsh WJ, Howlett AC. Regulation of G(i) by the CB1 cannabinoid receptor C-terminal juxtamembrane region: Structural requirements determined by peptide analysis. *Biochemistry*. 1999;38(11):3447–55.
 218. Xie XQ, Chen JZ. NMR structural comparison of the cytoplasmic juxtamembrane domains of G-protein-coupled CB1 and CB2 receptors in membrane mimetic dodecylphosphocholine micelles. *J Biol Chem*. 2005;280(5):3605–12.
 219. Bonhaus DW, Chang LK, Kwan J, Martin GR. Dual activation and inhibition of adenylyl cyclase by cannabinoid receptor agonists: evidence for agonist-specific trafficking of intracellular responses. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;287(3):884–8.

220. Rhee MH, Bayewitch M, Avidor-Reiss T, Levy R, Vogel Z. Cannabinoid receptor activation differentially regulates the various adenylyl cyclase isozymes. *J Neurochem*. 1998;71:1525–34.
221. Jarrahian A, Watts VJ, Barker EL, Lafayette W. D 2 Dopamine Receptors Modulate G_{βγ} - Subunit Coupling of the CB 1 Cannabinoid Receptor. *Pharmacology*. 2004;308(3):880–6.
222. Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Bourrié B, Canat X, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, et al. Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem J [Internet]*. 1995;312:637–41.
223. Derkinderen P, Valjent E, Toutant M, Corvol J-C, Enslen H, Ledent C, et al. Regulation of extracellular signal-regulated kinase by cannabinoids in hippocampus. *J Neurosci [Internet]*. 2003;23(6):2371–82.
224. Pan X, Ikeda SR, Lewis DL. SR 141716A acts as an inverse agonist to increase neuronal voltage-dependent Ca²⁺ currents by reversal of tonic CB1 cannabinoid receptor activity. *Mol Pharmacol [Internet]*. 1998;54(6):1064–72.
225. Stefano GB, Liu Y, Goligorsky MS. Cannabinoid receptors are coupled to nitric oxide release in invertebrate immunocytes, microglia, and human monocytes. *J Biol Chem*. 1996;271(32):19238–42.
226. Maccarrone M. Anandamide Uptake by Human Endothelial Cells and Its Regulation by Nitric Oxide. *J Biol Chem [Internet]*. 2000;275(18):13484–92.
227. Hillard CJ, Muthian S, Kearns CS. Effects of CB(1) cannabinoid receptor activation on cerebellar granule cell nitric oxide synthase activity. *FEBS Lett*. 1999;459(2):277–81.
228. Jin W, Brown S, Roche JP, Hsieh C, Cervera JP, Kooze A, et al. Distinct domains of the CB1 cannabinoid receptor mediate desensitization and internalization. *J Neurosci [Internet]*. 1999;19(10):3773–80.
229. Singh P, Ganjiwale A, Howlett AC, Cowsik SM. Molecular Interactions of Cannabinoid Receptor Interacting Protein 1 A and B with Cannabinoid Receptor 1. *Biophys J [Internet]*. 2017;112(3):54a.
230. Howlett AC, Blume LC, Dalton GD. CB(1) cannabinoid receptors and their associated proteins. *Curr Med Chem*. 2010;17(14):1382–93.
231. Mackie K. Cannabinoid receptor homo- and heterodimerization. *Life Sci*. 2005;77(14):1667–73.
232. Wager-Miller J, Westenbroek R, Mackie K. Dimerization of G protein-coupled receptors: CB1 cannabinoid receptors as an example. *Chem Phys Lipids*. 2002;121(1–2):83–9.
233. Callén L, Moreno E, Barroso-Chinea P, Moreno-Delgado D, Cortés A, Mallol J, et al. Cannabinoid receptors CB 1 and CB 2 form functional heteromers in brain. *J Biol Chem*. 2012;287(25):20851–65.
234. Martínez-Pinilla E, Reyes-Resina I, Oñativia-Astibia A, Zamarrubide M, Ricobaraza A, Navarro G, et al. CB1 and GPR55 receptors are co-expressed and form heteromers in rat and monkey striatum. *Exp Neurol [Internet]*. 2014;261:44–52.

235. Valk PJ, Delwel R. The peripheral cannabinoid receptor, Cb2, in retrovirally-induced leukemic transformation and normal hematopoiesis. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 1998;32(1–2):29–43.
236. Skaper SD, Buriani A, Dal Toso R, Petrelli L, Romanello S, Facci L, et al. The ALIAmide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1996;93(9):3984–9.
237. Ashton JC, Friberg D, Darlington CL, Smith PF. Expression of the cannabinoid CB2 receptor in the rat cerebellum: An immunohistochemical study. *Neurosci Lett*. 2006;396(2):113–6.
238. Gong JP, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu QR, Tagliaferro PA, Brusco A, et al. Cannabinoid CB2 receptors: Immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res*. 2006;1071(1):10–23.
239. Brusco A, Tagliaferro P, Saez T, Onaivi ES. Postsynaptic localization of CB2 cannabinoid receptors in the rat hippocampus. *Synapse*. 2008;62(12):944–9.
240. Beltramo M. Functional Role of High-Affinity Anandamide Transport, as Revealed by Selective Inhibition. *Science (80-)* [Internet]. 1997;277(5329):1094–7.
241. Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie K, Blond O, et al. Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol* [Internet]. 1995;48(3):443–50.
242. Expressing CL, Compton R, Abood E. Evaluation of Binding in a Transfected Cell Line Expressing a Peripheral Cannabinoid Receptor (CB2): Identification of Cannabinoid Receptor Subtype Selective Ligands1. *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. 1996;278(3):989–99.
243. Shire D, Calandra B, Bouaboula M, Barth F, Rinaldi-Carmona M, Casellas P, et al. Cannabinoid receptor interactions with the antagonists SR 141716A and SR 144528. *Life Sci*. 1999;65(6–7):627–35.
244. Song ZH, Slowey C a, Hurst DP, Reggio PH. The difference between the CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors at position 5.46 is crucial for the selectivity of WIN55212-2 for CB(2). *Mol Pharmacol* [Internet]. 1999;56(4):834–40.
245. Tao Q, Abood ME. Mutation of a highly conserved aspartate residue in the second transmembrane domain of the cannabinoid receptors, CB1 and CB2, disrupts G-protein coupling. *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. 1998;285(2):651–8.
246. Atwood BK, MacKie K. CB 2: A cannabinoid receptor with an identity crisis. *Br J Pharmacol*. 2010;160(3):467–79.
247. Sawzdargo M, Nguyen T, Lee DK, Lynch KR, Cheng R, Heng HHQ, et al. Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, Ψ GPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Mol Brain Res*. 1999;64(2):193–8.
248. Baker D, Pryce G, Davies WL, Hiley CR. In silico patent searching reveals a new

- cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol Sci*. 2006;27(1):1–4.
249. Oka S, Nakajima K, Yamashita A, Kishimoto S, Sugiura T. Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;362(4):928–34.
250. Lauckner JE, Jensen JB, Chen H-Y, Lu H-C, Hille B, Mackie K. GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2008;105(7):2699–704.
251. Henstridge CM, Balenga N a B, Ford L a, Ross R a, Waldhoer M, Irving AJ. The GPR55 ligand L-alpha-lysophosphatidylinositol promotes RhoA-dependent Ca²⁺ signaling and NFAT activation. *FASEB J* [Internet]. 2009;23(1):183–93.
252. Pertwee RG, Howlett a C, Abood ME, Alexander SPH, Marzo V Di, Elphick MR, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology . LXXIX . Cannabinoid Receptors and Their Ligands : Beyond CB 1 and CB 2. *Pharmacol Rev*. 2010;62(4):588–631.
253. Yin H, Chu A, Li W, Wang B, Shelton F, Otero F, et al. Lipid G protein-coupled receptor ligand identification using β -arrestin PathHunter™ assay. *J Biol Chem*. 2009;284(18):12328–38.
254. Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson N-O, Leonova J, et al. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2007;152(7):1092–101.
255. Kapur A, Zhao P, Sharir H, Bai Y, Caron MG, Barak LS, et al. Atypical responsiveness of the orphan receptor GPR55 to cannabinoid ligands. *J Biol Chem*. 2009;284(43):29817–27.
256. Oka S, Toshida T, Maruyama K, Nakajima K, Yamashita A, Sugiura T. 2-Arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphoinositol: A possible natural ligand for GPR55. *J Biochem*. 2009;145(1):13–20.
257. Anavi-Goffer S, Irving AJ, Ross RA. Modulation of l- α -lysophosphatidylinositol/GPR55 MAP kinase signalling by CB2 receptor agonists: Identifying novel GPR55 inhibitors. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2016;27(3):303–10.
258. Morales P, Jagerovic N. Advances towards the Discovery of GPR55 Ligands. *Curr Med Chem* [Internet]. 2016;23:DOI: 10.2174/0929867323666160425113836.
259. Morales P, Whyte LS, Chicharro R, Gómez-Cañas M, Pazos MR, Goya P, et al. Identification of Novel GPR55 Modulators Using Cell-Impedance-Based Label-Free Technology. *J Med Chem*. 2016;59(5):1840–53.
260. Console-Bram L, Ciuciu SM, Zhao P, Zipkin RE, Brailoiu E, Abood ME. N-arachidonoyl glycine, another endogenous agonist of GPR55. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2017;490(4):1389–93.
261. Henstridge CM, Brown AJ, Waldhoer M. GPR55: Metabolic Help or Hindrance? *Trends Endocrinol Metab* [Internet]. 2016;27(9):606–8.
262. María J. The L- [alpha] -Lysophosphatidylinositol / GPR55 System and Its Potential Role in Human Obesity. 2012;

263. Ishiguro H, Onaivi ES, Horiuchi Y, Imai K, Komaki G, Ishikawa T, et al. Functional polymorphism in the GPR55 gene is associated with anorexia nervosa. *Synapse*. 2011;65(2):103–8.
264. McKillop AM, Moran BM, Abdel-Wahab YHA, Flatt PR. Evaluation of the insulin releasing and antihyperglycaemic activities of GPR55 lipid agonists using clonal beta-cells, isolated pancreatic islets and mice. *Br J Pharmacol*. 2013;170(5):978–90.
265. Andradas C, Blasco-benito S, Castillo-Illuva S, Dillenburg- P, Diez-alarcia R, Juanes-garcía A, et al. Activation of the orphan receptor by lysophosphatidylinositol promotes metastasis in triple-negative breast cancer. 2016;7(30).
266. Sutphen R, Xu Y, Wilbanks GD, Fiorica J, Jr ECG, Lapolla JP, et al. Lysophospholipids Are Potential Biomarkers of Ovarian Cancer Lysophospholipids Are Potential Biomarkers of Ovarian Cancer. 2004;13(July):1185–91.
267. Andradas C, Caffarel MM, Pérez-Gómez E, Salazar M, Lorente M, Velasco G, et al. The orphan G protein-coupled receptor GPR55 promotes cancer cell proliferation via ERK. *Oncogene*. 2011;30(2):245–52.
268. Carey LM, Gutierrez T, Deng L, Lee W-H, Mackie K, Hohmann AG. Inflammatory and Neuropathic Nociception is Preserved in GPR55 Knockout Mice. *Sci Rep [Internet]*. 2017;7(1):944.
269. Li K, Fichna J, Schicho R, Saur D, Bashashati M, MacKie K, et al. A role for O-1602 and G protein-coupled receptor GPR55 in the control of colonic motility in mice. *Neuropharmacology [Internet]*. 2013;71:255–63.
270. Stančić A, Jandl K, Hasenöhr C, Reichmann F, Marsche G, Schuligoi R, et al. The GPR55 antagonist CID16020046 protects against intestinal inflammation. *Neurogastroenterol Motil*. 2015;27(10):1432–45.
271. Wu CS, Chen H, Sun H, Zhu J, Jew CP, Wager-Miller J, et al. GPR55, a G-Protein Coupled Receptor for Lysophosphatidylinositol, Plays a Role in Motor Coordination. *PLoS One*. 2013;8(4).
272. Celorrio M, Rojo-Bustamante E, Fernández-Suárez D, Sáez E, Estella-Hermoso de Mendoza A, Müller CE, et al. GPR55: A therapeutic target for Parkinson's disease? *Neuropharmacology [Internet]*. 2017;125:319–32.
273. Cherif H, Argaw A, Cécyre B, Bouchard A, Gagnon J, Javadi P, et al. Role of GPR55 during Axon Growth and Target Innervation(1,2,3). *eNeuro [Internet]*. 2015;2(5).
274. Reggio PH, Shore DM. The therapeutic potential of orphan GPCRs, GPR35 and GPR55. *Front Pharmacol*. 2015;6(MAR):1–22.
275. Ross RA. Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *Br J Pharmacol [Internet]*. 2003;140(5):790–801.
276. Fernandes ES, Fernandes MA, Keeble JE. The functions of TRPA1 and TRPV1: Moving away from sensory nerves. *Br J Pharmacol*. 2012;166(2):510–21.
277. Warner WA, Sanchez R, Dawoodian A, Li E, Momand J. TRPV1 gene deletion exacerbates

- inflammation and atypical cardiac remodeling after myocardial infarction. 2013;80(4):631–7.
278. Tóth A, Blumberg PM, Boczán J. Chapter 15 Anandamide and the Vanilloid Receptor (TRPV1). *Vitam Horm.* 2009;81(C):389–419.
 279. Vassilatis DK, Hohmann JG, Zeng H, Li F, Ranchalis JE, Mortrud MT, et al. The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2003;100(8):4903–8.
 280. Penumarti A, Abdel-Rahman AA. The Novel Endocannabinoid Receptor GPR18 Is Expressed in the Rostral Ventrolateral Medulla and Exerts Tonic Restraining Influence on Blood Pressure. *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. 2014;349(1):29–38.
 281. Finlay DB, Joseph WR, Grimsey NL, Glass M. GPR18 undergoes a high degree of constitutive trafficking but is unresponsive to N-Arachidonoyl Glycine. *PeerJ* [Internet]. 2016;4:e1835.
 282. McHugh D, Hu SSJ, Rimmerman N, Juknat A, Vogel Z, Walker JM, et al. N-arachidonoyl glycine, an abundant endogenous lipid, potently drives directed cellular migration through GPR18, the putative abnormal cannabidiol receptor. *BMC Neurosci* [Internet]. 2010;11:44.
 283. McHugh D, Page J, Dunn E, Bradshaw HB. Δ 9-tetrahydrocannabinol and N-arachidonoyl glycine are full agonists at GPR18 receptors and induce migration in human endometrial HEC-1B cells. *Br J Pharmacol.* 2012;165(8):2414–24.
 284. Kohno M, Hasegawa H, Inoue A, Muraoka M, Miyazaki T, Oka K, et al. Identification of N-arachidonoylglycine as the endogenous ligand for orphan G-protein-coupled receptor GPR18. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;347(3):827–32.
 285. Offertáler L, Mo F-M, Bátkaí S, Liu J, Begg M, Razdan RK, et al. Selective ligands and cellular effectors of a G protein-coupled endothelial cannabinoid receptor. *Mol Pharmacol.* 2003;63(3):699–705.
 286. Console-Bram L, Brailoiu E, Brailoiu GC, Sharir H, Abood ME. Activation of GPR18 by cannabinoid compounds: A tale of biased agonism. *Br J Pharmacol.* 2014;171(16):3908–17.
 287. Burstein SH, Huang SM, Petros TJ, Rossetti RG, Walker JM, Zurier RB. Regulation of anandamide tissue levels by N-arachidonoylglycine. *Biochem Pharmacol.* 2002;64(7):1147–50.
 288. Miller S, Leishman E, Oehler O, Daily L, Murataeva N, Wager-Miller J, et al. Evidence for a GPR18 role in diurnal regulation of intraocular pressure. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2016;57(14):6419–26.
 289. Fredriksson R, Höglund PJ, Gloriam DEI, Lagerström MC, Schiöth HB. Seven evolutionarily conserved human rhodopsin G protein-coupled receptors lacking close relatives. *FEBS Lett.* 2003;554(3):381–8.
 290. Hansen KB, Rosenkilde MM, Knop FK, Wellner N, Diep TA, Rehfeld JF, et al. 2-Oleoyl glycerol is a GPR119 agonist and signals GLP-1 release in humans. *J Clin Endocrinol*

- Metab. 2011;96(9):1409–17.
291. Free C, Christopherson J, Chen Q, Gao J, Liu C, Naji A, et al. Activation of GPR119 Stimulates Human β -Cell Replication and Neogenesis in Humanized Mice with Functional Human Islets. 2016;2016.
 292. Overton HA, Fyfe MCT, Reynet C. GPR119, a novel G protein-coupled receptor target for the treatment of type 2 diabetes and obesity. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2008;153 Suppl(October 2007):S76-81.
 293. Shah U, Kowalski TJ. GPR119 Agonists for the Potential Treatment of Type 2 Diabetes and Related Metabolic Disorders [Internet]. 1st ed. Vol. 84, Vitamins and Hormones. Elsevier Inc.; 2010. 415-448 p.
 294. Overton HA, Babbs AJ, Doel SM, Fyfe MCT, Gardner LS, Griffin G, et al. Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleoylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents. *Cell Metab*. 2006;3(3):167–75.
 295. Fattore L. Cannabinoids in Neurologic and Mental Disease. *Cannabinoids in Neurologic and Mental Disease*. 2015. 1-452 p.
 296. Chhor V, Le Charpentier T, Lebon S, Oré MV, Celador IL, Josserand J, et al. Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia In vitro. *Brain Behav Immun* [Internet]. 2013;32:70–85.
 297. Tang Y, Le W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol*. 2016;53(2):1181–94.
 298. Suh H-S, Zhao M-L, Derico L, Choi N, Lee SC. Insulin-like growth factor 1 and 2 (IGF1, IGF2) expression in human microglia: differential regulation by inflammatory mediators. *J Neuroinflammation* [Internet]. 2013;10(1):805.
 299. Sheng WS, Hu S, Min X, Cabral GA, Lokensgard JR, Peterson PK. Synthetic cannabinoid WIN55,212-2 inhibits generation of inflammatory mediators by IL-1 β -stimulated human astrocytes. *Glia*. 2005;49(2):211–9.
 300. Stella N. Endocannabinoid signaling in microglial cells. *Neuropharmacology* [Internet]. 2009;56(SUPPL. 1):244–53.
 301. Duarte JMN, Ferreira SG, Carvalho RA, Cunha RA, Köfalvi A. CB1 receptor activation inhibits neuronal and astrocytic intermediary metabolism in the rat hippocampus. *Neurochem Int* [Internet]. 2012;60(1):1–8.
 302. Carrier EJ, Kearn CS, Barkmeier AJ, Breese NM, Yang W, Nithipatikom K, et al. Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol, which increases proliferation via a CB2 receptor-dependent mechanism. *Mol Pharmacol*. 2004;65(4):999–1007.
 303. Marrs WR, Blankman JL, Horne EA, Thomazeau A, Lin YH, Coy J, et al. The serine hydrolase ABHD6 controls the accumulation and efficacy of 2-AG at cannabinoid receptors. *Nat Neurosci* [Internet]. 2010;13(8):951–7.
 304. Molina-Holgado F, Molina-Holgado E, Guaza C, Rothwell NJ. Role of CB1 and CB2

- receptors in the inhibitory effects of cannabinoids on lipopolysaccharide-induced nitric oxide release in astrocyte cultures. *J Neurosci Res*. 2002;67(6):829–36.
305. Shivachar AC. Cannabinoids inhibit sodium-dependent, high-affinity excitatory amino acid transport in cultured rat cortical astrocytes. *Biochem Pharmacol*. 2007;73(12):2004–11.
 306. Bari M, Bonifacino T, Milanese M, Spagnuolo P, Zappettini S, Battista N, et al. The endocannabinoid system in rat gliosomes and its role in the modulation of glutamate release. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(5):833–45.
 307. Esposito G, Iuvone T, Savani C, Scuderi C, Filippis D De, Papa M, et al. Opposing Control of Cannabinoid Receptor Stimulation on Amyloid- β -Induced Reactive Gliosis: In Vitro and in Vivo Evidence. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;322(3):1144–52.
 308. Walter L, Franklin A, Witting A, Wade C, Xie Y, Kunos G, et al. Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *J Neurosci [Internet]*. 2003;23(4):1398–405.
 309. Fraga D, Raborn ES, Ferreira GA, Cabral GA. Cannabinoids inhibit migration of microglial-like cells to the HIV protein tat. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2011;6(4):566–77.
 310. Basavarajappa BS, Shivakumar M, Joshi V, Subbanna S. Endocannabinoid system in neurodegenerative disorders. *J Neurochem [Internet]*. 2017;142(5):624–48.
 311. Stelzmann RA, Norman Schnitzlein H, Reed Murtagh F. An english translation of alzheimer's 1907 paper, "ber eine eigenartige erkankung der hirnrinde." *Clin Anat*. 1995;8(6):429–31.
 312. Glass M, Faull RLM, Dragunow M. Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study on the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience [Internet]*. 1997;77(2):299–318.
 313. Olsson F, Schmidt S, Althoff V, Munter LM, Jin S, Rosqvist S, et al. Characterization of intermediate steps in amyloid β (A β) production under near-native conditions. *J Biol Chem*. 2014;289(3):1540–50.
 314. Mietelska-Porowska A, Wasik U, Goras M, Filipek A, Niewiadomska G. Tau protein modifications and interactions: Their role in function and dysfunction. *Int J Mol Sci*. 2014;15(3):4671–713.
 315. Barbara A. J. Schaffer, MA; Lars Bertram, MD; Bruce L. Miller, MD; Kristina Mullin, BSc; Sandra Weintraub, PhD; Nancy Johnson, PhD; Eileen H. Bigio, MD; Marsel Mesulam, MD; Martina Wiedau-Pazos, MD, PhD; George R. Jackson, MD, PhD; Jeffrey L. Cummings, MD P. Association of GSK3B With Alzheimer Disease and Frontotemporal Dementia. *JAMA Neurol*. 2008;21(10):1–8.
 316. Maroof N, Ravipati S, Pardon MC, Barrett DA, Kendalla DA. Reductions in Endocannabinoid Levels and Enhanced Coupling of Cannabinoid Receptors in the Striatum are Accompanied by Cognitive Impairments in the A β PPswe/PS1 Δ E9 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis*. 2014;42(1):227–45.
 317. Köfalvi A, Lemos C, Martín-Moreno AM, Pinheiro BS, García-García L, Pozo MA, et al.

- Stimulation of brain glucose uptake by cannabinoid CB2 receptors and its therapeutic potential in Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*. 2016;110:519–29.
318. Solas M, Francis PT, Franco R, Ramirez MJ. CB2 receptor and amyloid pathology in frontal cortex of Alzheimer's disease patients. *Neurobiol Aging* [Internet]. 2013;34(3):805–8.
 319. Ehrhart J, Obregon D, Mori T, Hou H, Sun N, Bai Y, et al. Stimulation of cannabinoid receptor 2 (CB2) supresses microglial activation. *J Neuroinflammation* [Internet]. 2005;2:29.
 320. Gajardo-Gómez R, Labra VC, Maturana CJ, Shoji KF, Santibañez CA, S??ez JC, et al. Cannabinoids prevent the amyloid β -induced activation of astroglial hemichannels: A neuroprotective mechanism. *Glia*. 2017;65(1):122–37.
 321. Marsicano G, Goodenough S, Monory K, Hermann H, Eder M, Cannich A, et al. CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science* (80-). 2003;302(5642):84–8.
 322. Noonan J, Tanveer R, Klompas A, Gowran A, McKiernan J, Campbell VA. Endocannabinoids prevent β -amyloid-mediated lysosomal destabilization in cultured neurons. *J Biol Chem*. 2010;285(49):38543–54.
 323. D'Addario C, Di Francesco A, Arosio B, Gussago C, Dell'Osso B, Bari M, et al. Epigenetic regulation of Fatty acid amide Hydrolase in Alzheimer disease. *PLoS One*. 2012;7(6):1–7.
 324. Pascual AC, Martín-Moreno AM, Giusto NM, de Ceballos ML, Pasquaré SJ. Normal aging in rats and pathological aging in human Alzheimer's disease decrease FAAH activity: Modulation by cannabinoid agonists. *Exp Gerontol* [Internet]. 2014;60:92–9.
 325. Mulder J, Zilberter M, Pasquaré SJ, Alpár A, Schulte G, Ferreira SG, et al. Molecular reorganization of endocannabinoid signalling in Alzheimer's disease. *Brain*. 2011;134(4):1041–60.
 326. Chen R, Zhang J, Wu Y, Wang D, Feng G, Tang Y-P, et al. Monoacylglycerol lipase is a new therapeutic target for Alzheimer's disease. *Cell Rep* [Internet]. 2012;2(5):1329–39.
 327. Zhang J, Hu M, Teng Z, Tang Y-P, Chen C. Synaptic and Cognitive Improvements by Inhibition of 2-AG Metabolism Are through Upregulation of MicroRNA-188-3p in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Neurosci* [Internet]. 2014;34(45):14919–33.
 328. Tanveer R, Gowran A, Noonan J, Keating SE, Bowie AG, Campbell VA. The endocannabinoid, anandamide, augments notch-1 signaling in cultured cortical neurons exposed to amyloid- ?? and in the cortex of aged rats. *J Biol Chem*. 2012;287(41):34709–21.
 329. Competition L, Affects D, In I. Endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol protects neurons against β -amyloid insults. 2011;86(12):3279–88.
 330. Yan W, Yun Y, Ku T, Li G, Sang N. NO2 inhalation promotes Alzheimer's disease-like progression: cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E2 modulation and monoacylglycerol lipase inhibition-targeted medication. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(March):22429.

331. Aso E, Andrés-Benito P, Carmona M, Maldonado R, Ferrer I. Cannabinoid receptor 2 participates in amyloid- β processing in a mouse model of Alzheimer's disease but plays a minor role in the therapeutic properties of a cannabis-based medicine. *J Alzheimer's Dis.* 2016;51(2):489–500.
332. Libro R, Diomede F, Scionti D, Piattelli A, Grassi G, Pollastro F, et al. Cannabidiol Modulates the Expression of Alzheimer's Disease-Related Genes in Mesenchymal Stem Cells. *Int J Mol Sci.* 2016;18(1):1–19.
333. Shibata M, Yamada S, Ram Kumar S, Calero M, Bading J, Frangione B, et al. Clearance of Alzheimer's amyloid- β 1-40 peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J Clin Invest.* 2000;106(12):1489–99.
334. Bachmeier C, Beaulieu-Abdelahad D, Mullan M, Paris D. Role of the cannabinoid system in the transit of beta-amyloid across the blood-brain barrier. *Mol Cell Neurosci [Internet].* 2013;56:255–62.
335. Fakhfour G, Ahmadiani A, Rahimian R, Grolla AA, Moradi F, Haeri A. WIN55212-2 attenuates amyloid-beta-induced neuroinflammation in rats through activation of cannabinoid receptors and PPAR- γ pathway. *Neuropharmacology [Internet].* 2012;63(4):653–66.
336. Janefjord E, Mååg JL V, Harvey BS, Smid SD. Cannabinoid effects on β amyloid fibril and aggregate formation, neuronal and microglial-activated neurotoxicity in vitro. *Cell Mol Neurobiol.* 2014;34(1):31–42.
337. Schmöle A-C, Lundt R, Ternes S, Albayram Ö, Ulas T, Schultze JL, et al. Cannabinoid receptor 2 deficiency results in reduced neuroinflammation in an Alzheimer's disease mouse model. *Neurobiol Aging [Internet].* 2015;36(2):710–9.
338. Tolón RM, Núñez E, Pazos MR, Benito C, Castillo AI, Martínez-Orgado JA, et al. The activation of cannabinoid CB2 receptors stimulates in situ and in vitro beta-amyloid removal by human macrophages. *Brain Res [Internet].* 2009;1283:148–54.
339. Aso E, Juvés S, Maldonado R, Ferrer I. CB2 cannabinoid receptor agonist ameliorates alzheimer-like phenotype in A β PP/PS1 mice. *J Alzheimer's Dis.* 2013;35(4):847–58.
340. Bedse G, Romano A, Lavecchia AM, Cassano T, Gaetani S. The role of endocannabinoid signaling in the molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis.* 2014;43(4):1115–36.
341. Elbaz A, Carcaillon L, Kab S, Moisan F. Epidemiology of Parkinson's disease. *Rev Neurol (Paris).* 2008;225(1):18–32.
342. Van Den Eeden SK. Incidence of Parkinson's Disease: Variation by Age, Gender, and Race/Ethnicity. *Am J Epidemiol [Internet].* 2003;157(>11):1015–22.
343. Fahn S. Description of Parkinson's Disease as a Clinical Syndrome. *Ann New York Acad Sci.* 2003;991:1–14.
344. Power JHT, Barnes OL, Chegini F. Lewy Bodies and the Mechanisms of Neuronal Cell Death in Parkinson's Disease and Dementia with Lewy Bodies. *Brain Pathol [Internet].* 2017;27(1):3–12.

345. Snead D, Eliezer D. A-Synuclein Function and Dysfunction on Cellular Membranes. *Exp Neurobiol.* 2014;23(4):292–313.
346. Schroll H, Hamker FH. Computational models of basal-ganglia pathway functions: focus on functional neuroanatomy. *Front Syst Neurosci* [Internet]. 2013;7(December):1–18.
347. Taylor JM, Main BS, Crack PJ. Neuroinflammation and oxidative stress: Co-conspirators in the pathology of Parkinson's disease. *Neurochem Int* [Internet]. 2013;62(5):803–19.
348. Aureli C, Cassano T, Masci A, Francioso A, Martire S, Cocciolo A, et al. 5-S-cysteinyl-dopamine neurotoxicity: Influence on the expression of α -synuclein and ERp57 in cellular and animal models of Parkinson's disease. *J Neurosci Res.* 2014;92(3):347–58.
349. Glass M. Modulation of neurotransmission by cannabinoids in the basal ganglia. *Eur J Neurosci.* 1997;9(2):199–203.
350. Sañudo-Peña MC, Walker JM. Role of the subthalamic nucleus in cannabinoid actions in the substantia nigra of the rat. *J Neurophysiol.* 1997;77(3):1635–8.
351. Sañudo Peña MC, Force M, Tsou K, Miller AS, Walker JM. Effects of intrastriatal cannabinoids on rotational behaviour in rats: interactions with the dopaminergic system. *Synapse.* 1998;30(April 1997):221–6.
352. Maneuf YP, Nash JE, Crossman AR, Brotchie JM. Activation of the cannabinoid receptor by delta 9-tetrahydrocannabinol reduces gamma-aminobutyric acid uptake in the globus pallidus. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 1996;308(2):161–4.
353. van der Stelt M, Fox SH, Hill M, Crossman AR, Petrosino S, Di Marzo V, et al. A role for endocannabinoids in the generation of parkinsonism and levodopa-induced dyskinesia in MPTP-lesioned non-human primate models of Parkinson's disease. *FASEB J* [Internet]. 2005;19(9):1140–2.
354. Ferrer B, Asbrock N, Kathuria S, Piomelli D, Giuffrida A. Effects of levodopa on endocannabinoid levels in rat basal ganglia: Implications for the treatment of levodopa-induced dyskinesias. *Eur J Neurosci.* 2003;18(6):1607–14.
355. Di Marzo V, Hill MP, Bisogno T, Crossman AR, Brotchie JM. Enhanced levels of endogenous cannabinoids in the globus pallidus are associated with a reduction in movement in an animal model of Parkinson's disease. *FASEB J* [Internet]. 2000;14(10):1432–8.
356. Criscuolo C, Mancini P, Menchise V, Saccà F, De Michele G, Banfi S, et al. Very late onset in ataxia oculomotor apraxia type I [1]. *Ann Neurol.* 2005;57(5):777.
357. Mounsey RB, Mustafa S, Robinson L, Ross RA, Riedel G, Pertwee RG, et al. Increasing levels of the endocannabinoid 2-AG is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* [Internet]. 2015;273:36–44.
358. Viveros-Paredes JM, Gonzalez-Castañeda RE, Escalante-Castañeda A, Tejeda-Martínez AR, Castañeda-Achutiguí F, Flores-Soto ME. Efecto del inhibidor de amida hidrolasa de ácidos grasos en el daño neuronal dopaminérgico inducido por MPTP. *Neurología.* 2017;1–10.

359. Chung YC, Bok E, Huh SH, Park J-Y, Yoon S-H, Kim SR, et al. Cannabinoid Receptor Type 1 Protects Nigrostriatal Dopaminergic Neurons against MPTP Neurotoxicity by Inhibiting Microglial Activation. *J Immunol* [Internet]. 2011;187(12):6508–17.
360. Cebeira M, Ceballos ML De, Zeng B, Jenner P, Ramos JA. Increased cannabinoid CB 1 receptor binding and activation of GTP-binding proteins in the basal ganglia of patients with Parkinson's syndrome and of MPTP-treated marmosets. *Eur J Neurosci*. 2001;14:1827–32.
361. González S, Scorticati C, García-Arencibia M, De Miguel R, Ramos JA, Fernández-Ruiz J. Effects of rimonabant, a selective cannabinoid CB1 receptor antagonist, in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res*. 2006;1073–1074(1):209–19.
362. Hernandez-Baltazar D, Zavala-Flores LM, Villanueva-Olivo A. El modelo de 6-hidroxidopamina y la fisiopatología parkinsoniana: nuevos hallazgos en un viejo modelo. *Neurología* [Internet]. 2017;32(8):533–9.
363. Tadaiesky MT, Dombrowski P a, Da Cunha C, Takahashi RN. Effects of SR141716A on Cognitive and Depression-Related Behavior in an Animal Model of Premotor Parkinson's Disease. *Parkinsons Dis*. 2010;2010:238491.
364. Cerri S, Levandis G, Ambrosi G, Montepeloso E, Lanciego L, Baqi Y, et al. Neuroprotective Potential of Adenosine A 2A and Cannabinoid CB 1 Receptor Antagonists in an Animal Model of Parkinson Disease. 2014;73(5):414–24.
365. Maccarrone M, Gubellini P, Bari M, Picconi B, Battista N, Centonze D, et al. Levodopa treatment reverses endocannabinoid system abnormalities in experimental parkinsonism. *J Neurochem* [Internet]. 2003;85(4):1018–25.
366. Lastres-Becker I, Molina-Holgado F, Ramos JA, Mechoulam R, Fernández-Ruiz J. Cannabinoids provide neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity in vivo and in vitro: Relevance to Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*. 2005;19(1–2):96–107.
367. García-Arencibia M, García C, Kurz A, Rodríguez-Navarro JA, Gispert-Sánchez S, Mena MA, Auburger G, de Yébenes JG F-RJ. Cannabinoid CB1 receptors are early downregulated followed by a further upregulation in the basal ganglia of mice with deletion of specific park genes. *J Neural Transm Suppl*. 2009;73:269–75.
368. Filippo M Di, Picconi B, Tozzi A, Ghiglieri V, Rossi A, Calabresi P. The Endocannabinoid System in Parkinson's Disease. 2008;2337–46.
369. Price DA, Martinez AA, Seillier A, Koek W, Acosta Y, Fernandez E, et al. WIN55,212-2, a cannabinoid receptor agonist, protects against nigrostriatal cell loss in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci*. 2009;29(11):2177–86.
370. Gómez-Gálvez Y, Palomo-Garo C, Fernández-Ruiz J, García C. Potential of the cannabinoid CB₁ receptor as a pharmacological target against inflammation in Parkinson's disease. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* [Internet]. 2016;64:200–8.
371. Kovtun I V, McMurray CT. Features of trinucleotide repeat instability in vivo. *Cell Res* [Internet]. 2008;18(1):198–213.

372. Davies SW, Turmaine M, Cozens BA, DiFiglia M, Sharp AH, Ross CA, et al. Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell*. 1997;90(3):537–48.
373. Arrasate M, Mitra S, Schweitzer ES, Segal MR, Finkbeiner S. Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* [Internet]. 2004;431(7010):805–10.
374. Arrasate M, Finkbeiner S. Protein aggregates in Huntington's disease. *Exp Neurol*. 2012;238(1):1–11.
375. Quintanilla R, Johnson GV. Role of Mitochondrial Dysfunction in the Pathogenesis of Huntington's Disease. 2010;80:242–7.
376. Browne SE, Ferrante RJ, Beal MF. Oxidative stress in Huntington's disease. *Brain Pathol* [Internet]. 1999;9(1):147–63.
377. Tai YF, Pavese N, Gerhard A, Tabrizi SJ, Barker RA, Brooks DJ, et al. Microglial activation in presymptomatic Huntington's disease gene carriers. *Brain*. 2007;130(7):1759–66.
378. Glass M, Dragunow M, Faull RLM. The pattern of neurodegeneration in Huntington's disease: A comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and GABA(A) receptor alterations in the human basal ganglia in Huntington's disease. *Neuroscience*. 2000;97(3):505–19.
379. Dowie MJ, Bradshaw HB, Howard ML, Nicholson LFB, Faull RLM, Hannan AJ, et al. Altered CB1 receptor and endocannabinoid levels precede motor symptom onset in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neuroscience* [Internet]. 2009;163(1):456–65.
380. Bisogno T, Martire A, Petrosino S, Popoli P, Di Marzo V. Symptom-related changes of endocannabinoid and palmitoylethanolamide levels in brain areas of R6/2 mice, a transgenic model of Huntington's disease. *Neurochem Int*. 2008;52(1):307–13.
381. Denovan-Wright EM, Robertson HA. Cannabinoid receptor messenger RNA levels decrease in a subset of neurons of the lateral striatum, cortex and hippocampus of transgenic Huntington's disease mice. *Neuroscience*. 2000;98(4):705–13.
382. Bari M, Battista N, Valenza M, Mastrangelo N, Malaponti M, Catanzaro G, et al. In vitro and in vivo models of Huntington's disease show alterations in the endocannabinoid system. *FEBS J*. 2013;280(14):3376–88.
383. Battista N, Bari M, Tarditi A, Mariotti C, Bachoud-Lévi AC, Zuccato C, et al. Severe deficiency of the fatty acid amide hydrolase (FAAH) activity segregates with the Huntington's disease mutation in peripheral lymphocytes. *Neurobiol Dis*. 2007;27(1):108–16.
384. Centonze D, Rossi S, Prosperetti C, Tscherter A, Bernardi G, Maccarrone M, et al. Abnormal sensitivity to cannabinoid receptor stimulation might contribute to altered gamma-aminobutyric acid transmission in the striatum of R6/2 huntington's disease mice. *Biol Psychiatry*. 2005;57(12):1583–9.
385. Rikani AA, Choudhry Z, Choudhry AM, Rizvi N, Ikram H, Mobassarah NJ, et al. The mechanism of degeeration of striatal neuronal subtypes in Huntington disease. *Ann*

- Neurosci. 2014;21(3):112–4.
386. Allen KL, Waldvogel HJ, Glass M, Faull RLM. Cannabinoid (CB1), GABAA and GABAB receptor subunit changes in the globus pallidus in Huntington's disease. *J Chem Neuroanat.* 2009;37(4):266–81.
 387. Mievis S, Blum D, Ledent C. Worsening of Huntington disease phenotype in CB1 receptor knockout mice. *Neurobiol Dis.* 2011;42(3):524–9.
 388. Fernández-Ruiz J, Romero J, Velasco G, Tolón RM, Ramos JA, Guzmán M. Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival? *Trends Pharmacol Sci.* 2007;28(1):39–45.
 389. Fernández-Ruiz J, Pazos MR, García-Arencibia M, Sagredo O, Ramos JA. Role of CB2 receptors in neuroprotective effects of cannabinoids. *Mol Cell Endocrinol.* 2008;286(1–2 SUPPL. 1).
 390. Palazuelos J, Aguado T, Pazos MR, Julien B, Carrasco C, Resel E, et al. Microglial CB2 cannabinoid receptors are neuroprotective in Huntington's disease excitotoxicity. *Brain.* 2009;132(11):3152–64.
 391. Laprairie RB, Bagher AM, Kelly MEM, Denovan-Wright EM. Biased Type 1 Cannabinoid Receptor Signaling Influences Neuronal Viability in a Cell Culture Model of Huntington Disease. *Mol Pharmacol [Internet].* 2016;89(3):364–75.
 392. Maya-López M, Colín-González AL, Aguilera G, de Lima ME, Colpo-Ceolin A, Rangel-López E, et al. Neuroprotective effect of WIN55,212-2 against 3-nitropropionic acid-induced toxicity in the rat brain: Involvement of CB1 and NMDA receptors. *Am J Transl Res.* 2017;9(2):261–74.
 393. McGovern PE, Zhang J, Tang J, Zhang Z, Hall GR, Moreau RA, et al. Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *Proc Natl Acad Sci U S A [Internet].* 2004;101(51):17593–8.
 394. Wong SME, Fong E, Tauck DL, Kendig JJ. Ethanol as a general anesthetic: Actions in spinal cord. *Eur J Pharmacol.* 1997;329(2–3):121–7.
 395. Crabb DW, Bosron WF, Li T-K. Ethanol metabolism. *Pharmac Ther.* 1987;34:59–73.
 396. Lieber CS. Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clin Chim Acta.* 1997;257(1):59–84.
 397. Cederbaum AI. Alcohol Metabolism. *Clin Liver Dis [Internet].* 2012;16(4):667–85.
 398. Huang RD, Smith MF, Zahler WL. Inhibition of forskolin-activated adenylate cyclase by ethanol and other solvents. *J Cyclic Nucleotide Res [Internet].* 1982;8(6):385–94.
 399. Moonat S, Starkman BG, Sakharkar A, Pandey SC. Neuroscience of alcoholism: Molecular and cellular mechanisms. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67(1):73–88.
 400. Stubbs CD, Slater SJ. Ethanol and Protein Kinase C. *Alcohol Clin Exp Res.* 1999;23(9):1552–60.

401. Ayesta FJ. Bases bioquímicas y neurobiológicas de la adicción al alcohol. *Adicciones*. 2002;14(SUPPL. 1):63–78.
402. Hurtado AU, León ML, Gonzales L, León A, De Armas J, Rodriguez G. Bases neurobiológicas de la adicción al alcohol *Neurobiological Basis of Alcohol Addiction*. *Rev Finlay [Internet]*. 2014;4:40–53.
403. Costa E. From GABAA Receptor Diversity Emerges GABAergic Inhibition. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1998;(38):321–50.
404. Mehta AK, Ticku MK. An update on GABA(A) receptors. *Brain Res Rev*. 1999;29(2–3):196–217.
405. Sigel E, Steinmann ME. Structure, function, and modulation of GABAA receptors. *J Biol Chem*. 2012;287(48):40224–31.
406. Wafford KA, Whiting PJ. Ethanol potentiation of GABAA receptors requires phosphorylation of the alternatively spliced variant of the $\alpha 2$ subunit. *FEBS Lett*. 1992;313(2):113–7.
407. Hyytiä P, Koob GF. GABAA receptor antagonism in the extended amygdala decreases ethanol self-administration in rats. *Eur J Pharmacol*. 1995;283(1–3):151–9.
408. Engin E, Bakhurin KI, Smith KS, Hines RM, Reynolds LM, Tang W, et al. Neural basis of benzodiazepine reward: requirement for $\alpha 2$ containing GABAA receptors in the nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacology [Internet]*. 2014;39(8):1805–15.
409. Cowen MS, Lawrence AJ. The role of opioid-dopamine interactions in the induction and maintenance of ethanol consumption. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry*. 1999;23(7):1171–212.
410. Wirkner K, Poelchen W, Köles L, Mühlberg K, Scheibler P, Allgaier C, et al. Ethanol-induced inhibition of NMDA receptor channels. *Neurochem Int*. 1999;35(2):153–62.
411. Givens B, McMahon K. Ethanol suppresses the induction of long-term potentiation in vivo. *Brain Res*. 1995;688(1–2):27–33.
412. White AM. What happened? Alcohol, memory blackouts, and the brain. *Alcohol Res Health [Internet]*. 2003;27(2):186–96.
413. Xiang Y, Kim K-Y, Gelernter J, Park I-H, Zhang H. Ethanol upregulates NMDA receptor subunit gene expression in human embryonic stem cell-derived cortical neurons. *PLoS One*. 2015;10(8):e0134907.
414. Coomes TR, Smith SW. Successful use of propofol in refractory delirium tremens. *Ann Emerg Med*. 1997;30(December):825–8.
415. Zandy SL, Matthews DB, Tokunaga S, Miller AD, Blaha CD, Mittleman G. Reduced dopamine release in the nucleus accumbens core of adult rats following adolescent binge alcohol exposure: Age and dose-dependent analysis. *Psychopharmacology (Berl)*. 2015;232(4):777–84.
416. Weiss F, Parsons LH, Schulteis G, Hyytiä P, Lorang MT, Bloom FE, et al. Ethanol self-

- administration restores withdrawal-associated deficiencies in accumbal dopamine and 5-hydroxytryptamine release in dependent rats. *J Neurosci*. 1996;16(10):3474–85.
417. Thanos PK, Gopez V, Delis F, Grandy DK, Wang G, Kunos G, et al. Upregulation of cannabinoid type 1 receptors in dopamine D2 receptor knockout mice is reversed by chronic forced ethanol consumption. *Alcohol Clin Exp Res*. 2011;35(1):19–27.
 418. Basavarajappa BS, Hungund BL. Neuromodulatory role of the endocannabinoid signaling system in alcoholism: an overview. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2002;66(2–3):287–99.
 419. Basavarajappa BS. The endocannabinoid signaling system: a potential target for next-generation therapeutics for alcoholism. *Mini Rev Med Chem [Internet]*. 2007;7(8):769–79.
 420. Marinho EA V, Oliveira-Lima AJ, Santos R, Hollais AW, Baldaia MA, Wuo-Silva R, et al. Effects of rimonabant on the development of single dose-induced behavioral sensitization to ethanol, morphine and cocaine in mice. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry [Internet]*. 2015;58:22–31.
 421. Pavón FJ, Marco EM, Vázquez M, Sánchez L, Rivera P, Gavito A, et al. Effects of adolescent intermittent alcohol exposure on the expression of endocannabinoid signaling-related proteins in the spleen of young adult rats. *PLoS One*. 2016;11(9):1–21.
 422. Henricks AM, Berger AL, Lugo JM, Baxter-Potter LN, Bieniasz K V., Craft RM, et al. Sex differences in alcohol consumption and alterations in nucleus accumbens endocannabinoid mRNA in alcohol-dependent rats. *Neuroscience*. 2016;335:195–206.
 423. Hirvonen J, Zanotti-Fregonara P, Umhau JC, George DT, Rallis-Frutos D, Lyoo CH, et al. Reduced cannabinoid CB1 receptor binding in alcohol dependence measured with positron emission tomography. *Mol Psychiatry [Internet]*. 2013;18(8):916–21.
 424. Spagnolo PA, Ramchandani VA, Schwandt ML, Kwako LE, George DT, Mayo LM, et al. FAAH Gene Variation Moderates Stress Response and Symptom Severity in Patients with Posttraumatic Stress Disorder and Comorbid Alcohol Dependence. *Alcohol Clin Exp Res*. 2016;40(11):2426–34.
 425. Hartman RL, Brown TL, Milavetz G, Spurgin A, Gorelick DA, Gaffney G, et al. Controlled cannabis vaporizer administration: Blood and plasma cannabinoids with and without alcohol. *Clin Chem*. 2015;61(6):850–69.
 426. Jacobus J, McQueeney T, Bava S, Schweinsburg BC, Frank LR, Yang TT, et al. White matter integrity in adolescents with histories of marijuana use and binge drinking. *Neurotoxicol Teratol [Internet]*. 2009;31(6):349–55.
 427. Agudelo M, Yndart A, Morrison M, Figueroa G, Muñoz K, Samikkannu T, et al. Differential expression and functional role of cannabinoid genes in alcohol users. *Drug Alcohol Depend*. 2013;133(2):789–93.
 428. Chanda D, Kim YH, Li T, Misra J, Kim DK, Kim JR, et al. Hepatic Cannabinoid Receptor Type 1 Mediates Alcohol-Induced Regulation of Bile Acid Enzyme Genes Expression Via CREBH. *PLoS One*. 2013;8(7).

429. Fernández-Solari J, Scorticati C, Mohn C, De Laurentiis A, Billi S, Franchi A, et al. Alcohol inhibits luteinizing hormone-releasing hormone release by activating the endocannabinoid system. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2004;101(9):3264–8.
430. Subbanna S, Nagre NN, Umapathy NS, Pace BS, Basavarajappa BS. Ethanol exposure induces neonatal neurodegeneration by enhancing CB1R Exon1 Histone H4K8 acetylation and up-regulating CB1R function causing neurobehavioral abnormalities in adult mice. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2015;18(5):1–15.
431. Mitirattanakul S, López-Valdés HE, Liang J, Matsuka Y, Mackie K, Faull KF, et al. Bidirectional alterations of hippocampal cannabinoid 1 receptors and their endogenous ligands in a rat model of alcohol withdrawal and dependence. *Alcohol Clin Exp Res*. 2007;31(5):855–67.
432. Subbanna S, Shivakumar M, Psychoyos D, Xie S, Basavarajappa BS. Anandamide-CB1 receptor signaling contributes to postnatal ethanol-induced neonatal neurodegeneration, adult synaptic, and memory deficits. *J Neurosci* [Internet]. 2013;33(15):6350–66.
433. Rivera P, Blanco E, Bindila L, Alen F, Vargas A, Rubio L, et al. Pharmacological activation of CB2 receptors counteracts the deleterious effect of ethanol on cell proliferation in the main neurogenic zones of the adult rat brain. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2015;9(September):379.
434. Cho HS, Jeun SH, Li Q-Z, Kim KJ, Choi SJ, Sung K-W. Involvement of the endocannabinoid system in ethanol-induced corticostriatal synaptic depression. *J Pharmacol Sci*. 2012;120(1):45–9.
435. Talani G, Lovinger DM. Interactions between ethanol and the endocannabinoid system at GABAergic synapses on basolateral amygdala principal neurons. *Alcohol* [Internet]. 2015;49(8):781–94.
436. Sanchez-Marin L, Pavon FJ, Decara J, Suarez J, Gavito A, Castilla-Ortega E, et al. Effects of Intermittent Alcohol Exposure on Emotion and Cognition: A Potential Role for the Endogenous Cannabinoid System and Neuroinflammation. *Front Behav Neurosci* [Internet]. 2017;11(February):1–15.
437. Farré D, Muñoz A, Moreno E, Reyes-Resina I, Canet-Pons J, Dopeso-Reyes IG, et al. Stronger Dopamine D1 Receptor-Mediated Neurotransmission in Dyskinesia. *Mol Neurobiol*. 2015;52(3):1408–20.
438. Stella N. Endocannabinoid signaling in microglial cells Nephi. *Psychiatry Interpers Biol Process*. 2010;56(Suppl 1):244–53.
439. Galve-Roperh I, Aguado T, Palazuelos J, Guzmán M. Mechanisms of control of neuron survival by the endocannabinoid system. *Curr Pharm Des*. 2008;14(23):2279–88.
440. Benito C, Núñez E, Tolón RM, Carrier EJ, Rábano A, Hillard CJ, et al. Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains. *J Neurosci*. 2003;23(35):11136–41.
441. De Filippis D, Steardo A, D'Amico A, Scuderi C, Cipriano M, Esposito G, et al. Differential cannabinoid receptor expression during reactive gliosis: a possible implication for a

- nonpsychotropic neuroprotection. *ScientificWorldJournal* [Internet]. 2009;9:229–35.
442. Vázquez C, Tolón RM, Grande MT, Caraza M, Moreno M, Koester EC, et al. Endocannabinoid regulation of amyloid-induced neuroinflammation [Internet]. Vol. 36, *Neurobiology of Aging*. Elsevier Ltd; 2015. 3008-3019 p.
 443. Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, et al. High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci* [Internet]. 2000;20(11):4050–8.
 444. Rönicke R, Mikhaylova M, Rönicke S, Meinhardt J, Schröder UH, Fändrich M, et al. Early neuronal dysfunction by amyloid β oligomers depends on activation of NR2B-containing NMDA receptors. *Neurobiol Aging* [Internet]. 2011;32(12):2219–28.
 445. Grochowska KM, Yuanxiang P, Bär J, Raman R, Brugal G, Sahu G, et al. Posttranslational modification impact on the mechanism by which amyloid- β induces synaptic dysfunction. *EMBO Rep* [Internet]. 2017;18(6):962–81.
 446. Carriba P, Navarro G, Ciruela F, Ferré S, Casadó V, Agnati L, et al. Detection of heteromerization of more than two proteins by sequential BRET-FRET. *Nat Methods* [Internet]. 2008;5(8):727–33.
 447. Hradsky J, Mikhaylova M, Karpova A, Kreutz MR, Zuschratter W, Neuronal L. Calcium-Binding Proteins and RAGE. 2013;963:147–69.
 448. Erbacher P, Bettinger T, Belguise-Valladier P, Zou S, Coll JL, Behr JP, et al. Transfection and physical properties of various saccharide, poly(ethylene glycol), and antibody-derivatized polyethylenimines (PEI). *J Gene Med* [Internet]. 1999;1(3):210–22.
 449. Pulido-Salgado M, Vidal-Taboada JM, Garcia Diaz-Barriga G, Serratosa J, Valente T, Castillo P, et al. Myeloid C/EBP β deficiency reshapes microglial gene expression and is protective in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation* [Internet]. 2017;14(1):54.
 450. Saura J, Tusell JM, Serratosa J. High-Yield Isolation of Murine Microglia by Mild Trypsinization. *Glia*. 2003;44(3):183–9.
 451. Chen T-W, Wardill TJ, Sun Y, Pulver SR, Renninger SL, Baohan A, et al. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* [Internet]. 2013;499(7458):295–300.
 452. Hui-Chen Lu and KM 2. An introduction to the endogenous cannabinoid system Hui-Chen. 2017;14(7):1787–99.
 453. Bilkei-Gorzo A. The endocannabinoid system in normal and pathological brain ageing. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* [Internet]. 2012;367(1607):3326–41.
 454. Sierra S, Luquin N, Rico AJ, Gómez-Bautista V, Roda E, Dopeso-Reyes IG, et al. Detection of cannabinoid receptors CB1 and CB2 within basal ganglia output neurons in macaques: changes following experimental parkinsonism. *Brain Struct Funct*. 2015;220(5):2721–38.
 455. Tiziana Bisogno VDM. Cannabinoid Receptors and Endocannabinoids: Role in

- Neuroinflammatory and Neurodegenerative Disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2010;9(5):564–73.
456. P. Pacher And Mechoulam R. Is lipid signaling through cannabinoid 2 receptors part of a protective system? *Prog Lipid Res*. 2012;50(2):193–211.
 457. Simon K, Hennen S, Merten N, Blättermann S, Gillard M, Kostenis E, et al. The orphan G protein-coupled receptor GPR17 negatively regulates oligodendrocyte differentiation via Gai/o and its downstream effector molecules. *J Biol Chem*. 2016;291(2):705–18.
 458. Muñoz A, Garrido-Gil P, Dominguez-Meijide A, Labandeira-Garcia JL. Angiotensin type 1 receptor blockage reduces l-dopa-induced dyskinesia in the 6-OHDA model of Parkinson's disease. Involvement of vascular endothelial growth factor and interleukin-1 β . *Exp Neurol [Internet]*. 2014;261:720–32.
 459. Lyndsey E Collins-Praino, Yitshak I Francis, Erica Y Griffith, Anne F Wiegman, Jonathan Urbach, Arlene Lawton, Lawrence S Honig, Ety Cortes, Jean Paul G Vonsattel⁴, Peter D Canoll, James E Goldman and AMB. Soluble amyloid beta levels are elevated in the white matter of Alzheimer's patients, independent of cortical plaque severity. *Acta Neuropathol Commun [Internet]*. 2014;83(2):1–10.
 460. Bronzuoli MR, Iacomino A, Steardo L, Scuderi C. Targeting neuroinflammation in Alzheimer's disease. *J Inflamm Res*. 2016;9:199–208.
 461. Angulo E, Casadó V, Mallol J, Canela EI, Viñals F, Ferrer I, et al. A1 adenosine receptors accumulate in neurodegenerative structures in Alzheimer disease and mediate both amyloid precursor protein processing and tau phosphorylation and translocation. *Brain Pathol [Internet]*. 2003;13(4):440–51.
 462. Franco R, Cedazo-Minguez A. Successful therapies for Alzheimer's disease: Why so many in animal models and none in humans? *Front Pharmacol*. 2014;5 JUN(June):1–13.
 463. Madhavan PN MA. Alcohol Versus Cannabinoids: A Review of their Opposite Neuro-Immunomodulatory Effects and Future Therapeutic Potentials. *J Alcohol Drug Depend [Internet]*. 2015;3(1):1–17.
 464. Dolganiuc A. *In vitro* and *in vivo* models of acute alcohol exposure. *World J Gastroenterol [Internet]*. 2009;15(10):1168.
 465. Christopher M. Henstridge, Nariman A. B. Balenga, Julia Kargl, Clara Andradas, Andrew J. Brown, Andrew Irving, Cristina Sanchez and MW. Recent Developments in the Physiology and Pathology of the Lysophosphatidylinositol- Sensitive Receptor GPR55. *J Biol Chem*. 2011;25(11):1835–48.
 466. Kaplan BLF. The role of CB1 in immune modulation by cannabinoids. *Pharmacol Ther [Internet]*. 2013;137(3):365–74.
 467. Stella N. Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas. *Glia*. 2010;58(9):1017–30.
 468. Fishbein-Kaminietsky M, Gafni M, Sarne Y. Ultralow doses of cannabinoid drugs protect the mouse brain from inflammation-induced cognitive damage. *J Neurosci Res*. 2014;92(12):1669–77.

469. Fowler CJ, Rojo ML, Rodriguez-Gaztelumendi A. Modulation of the endocannabinoid system: Neuroprotection or neurotoxicity? *Exp Neurol* [Internet]. 2010;224(1):37–47.
470. Zoppi S, Pérez Nievas BG, Madrigal JLM, Manzanares J, Leza JC, García-Bueno B. Regulatory Role of Cannabinoid Receptor 1 in Stress-Induced Excitotoxicity and Neuroinflammation. *Neuropsychopharmacology* [Internet]. 2011;36(4):805–18.
471. Ribeiro R, Wen J, Li S, Zhang Y. Involvement of ERK1/2, cPLA2 and NF-KB in microglia suppression by cannabinoid receptor agonists and antagonists. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* [Internet]. 2013;100–101(1):1–14.
472. Fernández-Ruiz J, Romero J, Ramos JA. Endocannabinoids and Neurodegenerative Disorders: Parkinson’s Disease, Huntington’s Chorea, Alzheimer’s Disease, and Others [Internet]. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2015. 233-259 p.
473. Leonelli M, Torrão AS, Britto LRG. Unconventional neurotransmitters, neurodegeneration and neuroprotection. *Brazilian J Med Biol Res*. 2009;42(1):68–75.
474. Mecha M, Carrillo-Salinas FJ, Feliú A, Mestre L, Guaza C. Microglia activation states and cannabinoid system: Therapeutic implications. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2016;166:40–55.
475. Navarro G, Morales P, Rodríguez-Cueto C, Fernández-Ruiz J, Jagerovic N, Franco R. Targeting cannabinoid CB2 receptors in the central nervous system. Medicinal chemistry approaches with focus on neurodegenerative disorders. *Front Neurosci*. 2016;10(SEP):1–11.
476. Aso E, Ferrer I. Cannabinoids for treatment of alzheimer’s disease: Moving toward the clinic. *Front Pharmacol*. 2014;5 MAR(March):1–11.
477. Bu W, Ren H, Deng Y, Mar N Del, Guley NM, Moore BM, et al. Mild traumatic brain injury produces neuron loss that can be rescued by modulating microglial activation using a CB2 receptor inverse agonist. *Front Neurosci*. 2016;10(OCT).
478. Campbell VA, Gowran A. Alzheimer’s disease; taking the edge off with cannabinoids? *Br J Pharmacol* [Internet]. 2009;152(5):655–62.
479. Cabral GA, Griffin-Thomas L. Emerging role of the cannabinoid receptor CB2 in immune regulation: therapeutic prospects for neuroinflammation. *Expert Rev Mol Med* [Internet]. 2009;11(January):e3.
480. de Lago E, Fernández-Ruiz J. Cannabinoids and neuroprotection in motor-related disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets* [Internet]. 2007;6(6):377–87.
481. Fagan SG, Campbell VA. The influence of cannabinoids on generic traits of neurodegeneration. *Br J Pharmacol*. 2014;171(6):1347–60.
482. Sagredo O, García-Arencibia M, De Lago E, Finetti S, Decio A, Fernández-Ruiz J. Cannabinoids and neuroprotection in basal ganglia disorders. *Mol Neurobiol*. 2007;36(1):82–91.
483. Janssen B, Vugts DJ, Funke U, Molenaar GT, Kruijer PS, van Berckel BNM, et al. Imaging of neuroinflammation in Alzheimer’s disease, multiple sclerosis and stroke: Recent

- developments in positron emission tomography. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* [Internet]. 2016;1862(3):425–41.
484. Savonenko A V., Melnikova T, Wang Y, Ravert H, Gao Y, Koppel J, et al. Cannabinoid CB2 receptors in a mouse model of A β amyloidosis: Immunohistochemical analysis and suitability as a PET biomarker of neuroinflammation. *PLoS One*. 2015;10(6):1–23.
 485. Franco R, Fernández-Suárez D. Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. *Prog Neurobiol*. 2015;131:65–86.
 486. Aron Badin R, Spinnewyn B, Gaillard MC, Jan C, Malgorn C, van Camp N, et al. IRC-082451, a Novel Multitargeting Molecule, Reduces L-DOPA-Induced Dyskinesias in MPTP Parkinsonian Primates. *PLoS One*. 2013;8(1).
 487. Barnum CJ, Eskow KL, Dupre K, Jr PB, Deak T, Bishop C. EXOGENOUS CORTICOSTERONE REDUCES L-DOPA-INDUCED DYSKINESIA IN THE HEMI-PARKINSONIAN RAT: ROLE FOR INTERLEUKIN-1 β . *Neuroscience*. 2009;156(1):30–41.
 488. Concannon RM, Okine BN, Finn DP, Dowd E. Differential upregulation of the cannabinoid CB2 receptor in neurotoxic and inflammation-driven rat models of Parkinson's disease. *Exp Neurol* [Internet]. 2015;269:133–41.
 489. Chung YC, Shin WH, Baek JY, Cho EJ, Baik HH, Kim SR, et al. CB2 receptor activation prevents glial-derived neurotoxic mediator production, BBB leakage and peripheral immune cell infiltration and rescues dopamine neurons in the MPTP model of Parkinson's disease. *Exp Mol Med* [Internet]. 2016;48(1):e205-10.
 490. He Y, Appel S, Le W. Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum. 2001;909:187–93.
 491. Rom S, Persidsky Y. Cannabinoid receptor 2: potential role in immunomodulation and neuroinflammation. *J Neuroimmune Pharmacol* [Internet]. 2013;8(3):608–20.
 492. González S, Grazia Cascio M, Fernández-Ruiz J, Fezza F, Di Marzo V, Ramos JA. Changes in endocannabinoid contents in the brain of rats chronically exposed to nicotine, ethanol or cocaine. *Brain Res*. 2002;954(1):73–81.
 493. Hausknecht K, Shen Y-L, Wang R-X, Haj-Dahmane S, Shen R-Y. Prenatal Ethanol Exposure Persistently Alters Endocannabinoid Signaling and Endocannabinoid-Mediated Excitatory Synaptic Plasticity in Ventral Tegmental Area Dopamine Neurons. *J Neurosci* [Internet]. 2017;37(24):5798–808.
 494. Balla A, Dong B, Shilpa BM, Vemuri K, Makriyannis A, Pandey SC, et al. Cannabinoid-1 receptor neutral antagonist reduces binge-like alcohol consumption and alcohol-induced accumbal dopaminergic signaling. *Neuropharmacology* [Internet]. 2017;
 495. Silva AAF, Barbosa-Souza E, Confessor-Carvalho C, Silva RRR, De Brito ACL, Cata-Preta EG, et al. Context-dependent effects of rimonabant on ethanol-induced conditioned place preference in female mice. *Drug Alcohol Depend* [Internet]. 2017;179:317–24.
 496. Ortega-Álvarez A, Ternianov A, Aracil-Fernández A, Navarrete F, García-Gutiérrez MS, Manzanares J. Role of cannabinoid CB2receptor in the reinforcing actions of ethanol. *Addict Biol*. 2015;20(1):43–55.

497. Ishiguro H, Iwasaki S, Teasenfiz L, Higuchi S, Horiuchi Y, Saito T, et al. Involvement of cannabinoid CB2 receptor in alcohol preference in mice and alcoholism in humans. *Pharmacogenomics J*. 2007;7(6):380–5.
498. Subbanna S, Shivakumar M, Psychoyos D, Xie S, Basavarajappa BS. Anandamide-CB1 Receptor Signaling Contributes to Postnatal Ethanol-Induced Neonatal Neurodegeneration, Adult Synaptic, and Memory Deficits. *J Neurosci* [Internet]. 2013;33(15):6350–66.
499. Hurst K1, Badgley C1, Ellsworth T1, Bell S1, 2, Friend L1, 2, Prince B1, Welch J1, Cowan Z1, Williamson R1, 2, Lyon C1, Anderson B1, Poole B1, 2, Christensen M1, 2, McNeil M1, Call J1, Edwards JG1 2. A putative lysophosphatidylinositol receptor GPR55 modulates hippocampal synaptic plasticity. *Hippocampus*. 2017;9:985–98.
500. Kramar C, Loureiro M, Renard J, Laviolette SR. Palmitoylethanolamide Modulates GPR55 Receptor Signaling in the Ventral Hippocampus to Regulate Mesolimbic Dopamine Activity, Social Interaction, and Memory Processing. *Cannabis Cannabinoid Res* [Internet]. 2017;2(1):8–20.
501. Tóth ME, Vigh L, Sántha M. Alcohol stress, membranes, and chaperones. *Cell Stress Chaperones*. 2014;19(3):299–309.
502. Pava MJ, Woodward JJ. Chronic ethanol alters network activity and endocannabinoid signaling in the prefrontal cortex. *Front Integr Neurosci* [Internet]. 2014;8(July):1–12.
503. DuPont CM, Coppola JJ, Kaercher RM, Lindquist DH. Impaired trace fear conditioning and diminished ERK1/2 phosphorylation in the dorsal hippocampus of adult rats administered alcohol as neonates. *Behav Neurosci* [Internet]. 2014;128(2):187–98.
504. Rabin RA MP. Activation of adenylate cyclase by ethanol in mouse striatal tissue. *J Pharmacol Exp*. 1981;216(1):129–34.
505. Kim J, Li Y. Chronic activation of CB2 cannabinoid receptors in the hippocampus increases excitatory synaptic transmission. *J Physiol* [Internet]. 2015;593(4):871–86.
506. Li Y, Kim J. Deletion of CB2 cannabinoid receptors reduces synaptic transmission and long-term potentiation in the mouse hippocampus. *Hippocampus*. 2016;26(3):275–81.
507. Li Y, Kim J. Distinct roles of neuronal and microglial CB2 cannabinoid receptors in the mouse hippocampus. *Neuroscience* [Internet]. 2017;363(August):11–25.
508. Kaminski NE. Immune regulation by cannabinoid compounds through the inhibition of the cyclic AMP signaling cascade and altered gene expression. *Biochem Pharmacol*. 1996;52(8):1133–40.
509. Malfitano AM, Basu S, Maresz K, Bifulco M, Dittel BN. What we know and do not know about the cannabinoid receptor 2 (CB2). *Semin Immunol* [Internet]. 2014;26(5):369–79.
510. Qin L, Crews FT. Chronic ethanol increases systemic TLR3 agonist-induced neuroinflammation and neurodegeneration. *J Neuroinflammation* [Internet]. 2012;9(1):603.
511. Cantacorps L, Alfonso-Loeches S, Moscoso-Castro M, Cuitavi J, Gracia-Rubio I, López-

- Arnau R, et al. Maternal alcohol binge drinking induces persistent neuroinflammation associated with myelin damage and behavioural dysfunctions in offspring mice. *Neuropharmacology*. 2017;123:368–84.
512. Palazuelos J, Aguado T, Egia A, Mechoulam R, Guzmán M, Galve-Roperh I. Non-psychoactive CB2 cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation. *FASEB J*. 2006;20(13):2405–7.
513. Wang WY, Yang R, Hu SF, Wang H, Ma ZW, Lu Y. N-stearoyl-L-tyrosine ameliorates sevoflurane induced neuroapoptosis via MEK/ERK1/2 MAPK signaling pathway in the developing brain. *Neurosci Lett [Internet]*. 2013;541:167–72.
514. Geil CR, Hayes DM, McClain JA, Liput DJ, Marshall SA, Chen KY, et al. Alcohol and adult hippocampal neurogenesis: Promiscuous drug, wanton effects. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry [Internet]*. 2014;54:103–13.
515. Marina Spanosc, Joyce Besheera, b, c and CWH. Increased Sensitivity to Alcohol Induced Changes in ERK Map Kinase Phosphorylation and Memory Disruption in Adolescent as Compared to Adult C57BL/6J Mice. 2013;230(1):158–66.
516. Amin FU, Shah SA, Kim MO. Glycine inhibits ethanol-induced oxidative stress, neuroinflammation and apoptotic neurodegeneration in postnatal rat brain. *Neurochem Int [Internet]*. 2016;
517. Drzazga A, Sowinska A, Krzeminska A, Rytczak P. Lysophosphatidylcholine elicits intracellular calcium signaling in GPR55-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun [Internet]*. 2017;
518. Bruno A. Marichal-Cancino*, Alfonso Fajardo-Valdez, Alejandra E. Ruiz-Contreras, Monica Mendez-Díaz OP-G. Advances in the Physiology of GPR55 in the Central Nervous System. *Curr Neuropharmacol*. 2017;15(5):771–8.
519. Sylantyev S, Jensen TP, Ross RA, Rusakov DA. receptor GPR55 boosts neurotransmitter release at central synapses. 2013;110(13):2–7.
520. Qian W, Yin N, Gao F, Miao Y, Li Q, Li F, et al. Cannabinoid CB1 and CB2 receptors differentially modulate L- and T-type Ca²⁺ channels in rat retinal ganglion cells. *Neuropharmacology [Internet]*. 2017

¡La commedia è finita!

Iñigo Javier Etayo Labiano

Universidad de Barcelona

Departamento de Bioquímica y Biomedicina Molecular

Grupo de Neurobiología Molecular

Barcelona, 2018.

