



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Potencial dels heteròmers de receptors d'adenosina i de cannabinoïdes com a dianes terapèutiques en malalties neurodegeneratives i obesitat

Alejandro Lillo Márquez

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.



**Potencial dels heteròmers de receptors
d'adenosina i de cannabinoides com a
dianes terapèutiques en malalties
neurodegeneratives i obesitat**

Alejandro Lillo Márquez



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I FISIOLOGIA

*Potencial dels heteròmers de receptors d'adenosina i de cannabinoides
com a dianes terapèutiques en malalties neurodegeneratives i obesitat*

Memòria presentada pel graduat en Biotecnologia

ALEJANDRO LILLO MÁRQUEZ

per a optar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona

Aquesta Tesi Doctoral s'ha inscrit dins del programa de doctorat en Biomedicina del
Departament de Bioquímica i Fisiologia de la Universitat de Barcelona

La feina experimental i la redacció de la present memòria ha estat realitzat per
l'Alejandro Lillo Márquez sota la direcció de la Dra. Gemma Navarro Brugal i el Dr.
Rafael Franco Fernández.

Dra. Gemma Navarro Brugal
Tutora i Directora

Dr. Rafael Franco Fernández
Director

Alejandro Lillo Márquez

Barcelona, Febrer de 2023

RESUM

Els receptors acoblats a proteïna G o GPCR conformen la major superfamília de proteïnes de membrana cel·lular en organismes eucariotes. De fet, en humans s'han descrit més de 800 tipus de GPCR diferents que suposen al voltant d'un 5% del total del genoma humà. En l'actualitat, ostenten una gran rellevància terapèutica, ja que més del 30% dels fàrmacs aprovats per la FDA (*Food and Drug Administration*) tenen com a diana terapèutica un d'aquests receptors. Per aquest motiu, els GPCR presenten un gran potencial per a la recerca biomèdica. A més, aquests receptors són capaços d'interaccionar específicament entre ells, originant noves unitats funcionals amb propietats diferents a les que presenten els receptors individualment. En aquest sentit, el procés d'heteromerització entre GPCR és una estratègia puntera pel descobriment de noves dianes terapèutiques per tal de fer front a diverses patologies altament esteses en la nostra societat tals com les malalties neurodegeneratives o l'obesitat.

L'objectiu principal d'aquesta Tesi Doctoral ha estat estudiar la possible interacció molecular entre diversos receptors acoblats a proteïna G. En primer lloc, s'ha estudiat la interacció dels receptors cannabinoides CB₁ i CB₂ amb el receptor de grelina GHS-R1a, per tal d'explicar un dels mecanismes d'acció a través del qual els cannabinoides són capaços de modular processos fisiològics com la sensació de gana i el control del pes corporal. També s'ha valorat l'expressió dels heteròmers CB₁R-GHS-R1a i CB₂R-GHS-R1a en ratolins alimentats amb una dieta hipercalòrica com a model animal d'obesitat. Els resultats d'aquesta Tesi Doctoral ens demostren que els receptors cannabinoides CB₁ i CB₂ són capaços d'interaccionar amb el receptor de grelina GHS-R1a i, en ambdós contextos heteromèrics, trobem un bloqueig de la senyalització G_i cannabinoide. A més, s'ha demostrat una sobreexpressió dels heteròmers CB₁R-GHS-R1a i CB₂R-GHS-R1a en episodis d'obesitat. A més, s'ha caracteritzat l'agonisme esbiaixat de diverses formes àcides i varíniques dels fitocannabinoides CBD, CBG i Δ⁹-THC al interaccionar amb els receptors CB₁, CB₂ i amb l'heteròmer CB₁R-CB₂R.

El segon gran objectiu d'aquesta Tesi Doctoral ha consistit en valorar la possible interacció entre els receptors d'adenosina A_{2A} i A₃ i determinar la seva implicació en malalties neurodegeneratives, emprant ratolins APP_{Sw,Ind} com a model animal d'Alzheimer i ratolins tractats amb cuprizona com a model animal d'Esclerosi Múltiple. La funcionalitat característica dels nous heteròmers descrits en aquest estudi s'ha determinat mitjançant l'anàlisi de diverses vies de senyalització com són l'acumulació d'AMPc intracel·lular, la mobilització del Ca²⁺, la fosforilació de les MAPK, el reclutament de β-arrestines i la redistribució dinàmica de masses. El segon gran bloc de resultats d'aquesta Tesi Doctoral demostra que els receptors d'adenosina A_{2A} i A₃ són capaços d'interaccionar formant una nova unitat funcional que resulta en un bloqueig de la senyalització G_i del receptor A₃. Paral·lelament, s'ha determinat una sobreexpressió dels heteròmers A_{2A}R-A₃R en malalties neurodegeneratives tals com l'Alzheimer i l'Esclerosi Múltiple. Per tant, els heteròmers A_{2A}R-A₃R es postulen com a grans dianes terapèutiques per combatre aquest tipus de patologies fent ús, per exemple, d'antagonistes del receptor A_{2A} que bloquegin el caràcter pro-inflamatori d'aquest receptor mentre potencien el caràcter anti-inflamatori del receptor A₃.

ABSTRACT

G protein coupled receptors or GPCRs are the largest superfamily of cell membrane proteins in eukaryotic organisms. In fact, more than 800 different types of GPCRs have been described in humans, accounting for about 5% of the total human genome. Currently, they are considered of great therapeutic relevance because more than 30% of FDA-approved drugs have one of these receptors as a therapeutic target. For this reason, GPCRs have great potential in biomedical research. Moreover, these receptors can specifically interact with each other, giving rise to new functional units with different properties from those of the individual receptors. Therefore, the process of heteromerization between GPCRs is a novel strategy for the discovery of new therapeutic targets to combat different pathologies that are highly prevalent in our society, such as neurodegenerative diseases and obesity.

The main objective of this PhD Thesis has been to study the possible molecular interactions between different types of G protein coupled receptors. Firstly, the possible interaction of the cannabinoid receptors CB₁ and CB₂ with the ghrelin receptor GHS-R1a has been analyzed in order to explain one of the mechanisms of action through which cannabinoids are able to modulate physiological processes such as the food intake and the control of body weight. In addition, the expression of CB₁R-GHS-R1a and CB₂R-GHS-R1a heteromers has been assessed in mice fed with a high-fat diet as an animal model of obesity. The results of this PhD Thesis demonstrate that the cannabinoid receptors CB₁ and CB₂ are able to interact with the ghrelin receptor GHS-R1a and, in both heteromeric contexts, the interaction results in a blockade of G_i cannabinoid signaling. Furthermore, overexpression of CB₁R-GHS-R1a and CB₂R-GHS-R1a heteromers has been demonstrated in episodes of obesity. Moreover, the biased agonism of different acidic and varinic forms of the phytocannabinoids CBD, CBG and Δ⁹-THC has been characterized when interacting with CB₁R, CB₂R and the CB₁R-CB₂R heteromer.

Next, the second major objective of this PhD Thesis has been to assess the possible interaction between adenosine A_{2A} and A₃ receptors and to determine their physiological role in neurodegenerative diseases, using APP_{Sw,Ind} mice as an animal model of Alzheimer's disease and cuprizone treated mice as an animal model of Multiple Sclerosis. The characteristic functionality of the new heteromers described in this study has been determined by analyzing several signaling pathways such as intracellular cAMP accumulation, Ca²⁺ mobilization, ERK1/2 phosphorylation, β-arrestin recruitment and dynamic mass redistribution. Finally, the second major block of results of this PhD Thesis demonstrates that the A_{2A} and A₃ adenosine receptors are able to interact forming a new functional unit that results in a blockade of the G_i signaling of the A₃ receptor. In parallel, overexpression of A_{2A}R-A₃R heteromers has been found in animal models of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and Multiple Sclerosis. Therefore, A_{2A}R-A₃R heteromers are postulated as novel therapeutic targets to combat this type of pathologies, using A_{2A} receptor antagonists in order to block the pro-inflammatory character of this receptor while potentiating the anti-inflammatory character of the A₃ receptor.



*Siguis on siguis, tot això és per tu.
Espero que estiguis molt orgullosa del teu fill.*

AGRAÏMENTS

Sincerament, em considero una persona que no expressa el seus sentiments fàcilment, però no se m'acudeix millor manera de començar la redacció d'aquesta Tesi Doctoral que fent una menció especial a totes aquelles persones que m'han acompanyat durant aquests quatre anys, amb qui he pogut viure moments únics i ells són els que m'han ajudat sempre que ho he necessitat. Durant aquests quatre anys, han passat moltíssimes coses, algunes bones i d'altres no tant bones, però gràcies al recolzament que he tingut per part de vosaltres, els moments durs s'han convertit en suportables i els moments bons s'han convertit en màgics.

Primer de tot, m'agradaria començar per la meva família més propera, amb qui he compartit sostre gairebé durant tot el transcurs d'aquesta aventura, el meu pare, la meva mare i la meva germana. Malauradament, la meva mare patia Esclerosi Múltiple i ja no està present en aquest final d'etapa però el que més desitjo en aquest món és que, siguis on siguis, espero que estiguis molt orgullosa de mi. No us podeu imaginar quantíssimes coses he pogut aprendre de la meva mare ja que era una persona feliç, lluitadora, altruista, amiga dels seus amics, generosa, amable, riallera i, per suposat, guapíssima tant per dins com per fora. Tant de bo estiguessis aquí amb nosaltres per poder seguir compartint moments inoblidables però, de vegades la vida és molt injusta, i ara només està present en cadascun dels nostres cors. M'agradaria que et quedés molt clar que, avui en dia, sóc la persona que sóc gràcies a tot el que he pogut aprendre de tu. En segon lloc, voldria donar les gràcies al meu pare ja que ell sempre està al meu costat quan el necessito i per mi és el meu màxim recolzament i un exemple a seguir. De fet, quan era més petit em preguntaven que què volia ser de gran i jo, enlloc de contestar "futbolista" o "astronauta" tal i com deien la resta dels meus amics, jo sempre deia "jo vull ser com el meu pare". Des de el meu punt de vista, el meu pare sempre ha sigut i serà un ídol per mi ja que he pogut veure amb els meus propis ulls com cuidava durant molts i molts anys a la meva mare i sempre amb una actitud admirablement optimista i amb un somriure a la cara i fent que la situació ens afectés el més mínim a la meva germana petita i a mi. El meu pare és la persona més bona, positiva i generosa que conec i tant de bo pogués ser en un futur una petita part de la persona que és ell. A més, tant el meu pare com la meva mare m'han ensenyat, cada cop que es miraven als ulls, el que és l'amor de veritat i per tota la vida. Per últim, no puc acabar aquest bloc familiar sense mencionar a la persona més important per mi en aquest món, la meva germana petita. Tal i com acabo de dir, ella és la petita de la família però us en faríeu creus de la quantitat de coses que m'ha ensenyat i em segueix ensenyant dia a dia. Des de sempre, hem tingut una relació de germans increïble, basada en el bon rotllo i la confiança i estic segur de que això mai canviarà. Vull que sàpigues que sempre em tindràs pel que necessitis, igual que jo tinc clar que sempre et tindrà a tu, passi el que passi. No puc estar més orgullós de la persona en la que t'estàs convertint, segueix lluitant pels teus somnis tal i com ho fas que nosaltres sempre estarem amb tu pel que faci falta, encara que no ens necessitis. M'agradaria acabar aquest bloc familiar dient-vos que us estimo moltíssim als tres i que, encara que la vida ens separi físicament, sempre serem una pinya increïble.

Després de la família més propera, amb qui he compartit més temps durant els transcurso d'aquesta aventura ha estat amb els meus companys del laboratori. Més que companys, amics. Primer de tot, m'agradaria començar per la meva tutora, mentora, confident i amiga, la Gemma, volia dir-te que moltes gràcies per ser la meva mare científica, tant dins com fora del laboratori, per estar sempre al meu costat en els moments més durs i per lluitar sempre perquè cada dia al laboratori sigui únic i irreplicable. Sense tu res d'això hagués estat possible, moltíssimes gràcies per confiar en mi des del primer moment i fer-me millorar durant aquests cinc anys junts com a professional i, sobretot, com a persona. Vull que sàpigues que pots comptar amb mi pel que faci falta igual que tu m'has demostrat que puc comptar amb tu pel que sigui. Mai t'oblidaré i espero, de tot cor, que no perdem el contacte encara que els nostres camins es separin. També m'agradaria fer menció al meu co-director d'aquesta Tesi Doctoral, el Rafael Franco, volia donar-te les gràcies per ser un jefe tant divertit i proper, sempre que hem compartit moments junts m'he trobat molt còmode i a gust, des d'una reunió al teu despatx fins a unes birretes al bar de la Facultat o uns pinxos per Pamplona. Gràcies per acompanyar-me durant aquests anys i per preocupar-te per nosaltres. Ara, encara que marxi del laboratori, m'agradaria no perdre el contacte amb cap dels dos perquè sou unes persones admirables que vull tenir dins la meua vida. Us aniré fent visites al laboratori perquè no us oblideu de mi! També m'agradaria mencionar a la Irene, que des del primer dia em va brindar la seva ajuda i era la meua brúixola quan encara no dominava gaire les tècniques del laboratori, tant ella com el Rafa petit, han estat les persones que més m'han ajudat durant el transcurs d'aquesta Tesi Doctoral. Amb la Irene vam poder compartir molts bons moments només a l'inici i al final d'aquesta aventura, ja que durant dos anys ella va marxar a fer el post-doc a Alemanya, però ara que definitivament t'estàs construint la vida a Barcelona, la meua ciutat natal, estic segur que no perdrem el contacte i seguirem sumant moments i aventures! Moltíssimes gràcies per tot Irene, ha sigut un plaer poder compartir aquests anys amb tu.

Si seguim per ordre de veterania al laboratori, ara em toca parlar una mica d'en Rafa Petit, Reifel para los amigos. Volia donar-te les gràcies per tots els moments viscuts junts, des de les viciades a la Switch a casa teua fins les festes de techno per Berlín, i moltes gràcies per tota l'ajuda rebuda durant el desenvolupament d'aquesta Tesi Doctoral, ets de les persones més bondadoses i intel·ligents que he conegut mai, espero de tot cor que no perdem mai el contacte i que sempre formem part de les nostres vides d'una manera o d'una altra. Eres muy grande Reifel! I a tu, Jaume, t'estimo tant que no sé ni per on començar. Gràcies per ser apart d'un cosí, un referent. Si quan em faci gran aconseguixo ser una quarta part de la persona que ets tu, ja em puc donar per satisfet. T'estimo i t'admiro molt cosinet, ets el millor i sempre ho seràs als meus ulls. Ara canviem d'etapa però et puc assegurar que la nostra relació, més pròpia de germans que de cosins, mai canviarà. I ara seguim amb un dels pilars fonamentals per mi durant aquesta aventura i des del minut 1, l'lu, gràcies per ser com ets i omplir de color els dies al laboratori. Ets la persona més pura, sincera i divertida que conec, com tu no hi ha ningú company! M'has ensenyat moltíssimes coses que m'han fet millorar dia a dia com a persona durant aquests cinc anys junts. Seguiria treballant amb tu colze amb colze durant tota la vida perquè de veritat que fas que cada dia sigui una nova aventura. Ha estat un veritable plaer que els nostres camins s'hagin creuat i ja et dic jo que, per part meua, no penso perdre el contacte amb tu per res del món. Ets un crack titu no canviïs

mai i no perdis la teva essència, t'estimo molt. No puc seguir com Déu mana amb aquests agraïments sense parlar de la Cati, una persona que des del primer moment m'ha demostrat que val or. Moltes gràcies per tots els moments viscuts i per demostrar-me que és possible sortir de festa sense pillar una taja històrica. Espero que a la primera persona que portis de festa amb cotxe quan tinguis el carnet sigui a mi! Gràcies per ser com ets, per ajudar-me sempre que ho he necessitat i per pegar-nos la bronca quan ens la mereixíem. Queda pendent una visita a Menorca per conèixer a la teva fantàstica mare! M'agradaria seguir amb aquesta dicotomia parlant de la Clàudia, que és com un eclipse perquè la veiem de tant en quant, però quin eclipse més bonic! Dono les gràcies a la vida per creuar-me en el camí amb persones com tu, en el món de la ciència no és fàcil trobar persones amb les que es pugui encaixar tant bé i considero que les nostres energies combinen a la perfecció. Volia donar-te les gràcies per tots els bons moments viscuts junts i per endinsar-me tant en la teva vida i conèixer així persones tant meravelloses com el Nil, el Moya, el David o el Juanen, tots ells són tant increïbles com tu i, espero poder seguir formant part d'aquesta colla que has construït. Ara que ja has tornat de USA recuperarem tot el temps perdut i prepara't perquè venen corbes! És impossible completar aquest bloc d'agraïments sense donar les gràcies a la incorporació més recent, en Joan Biel, una llegenda de persona tant per dins com per fora. Juntament amb en Joan Contestí, volia dir-vos que simplement sou éssers de llum, irradieu felicitat i bones vibracions i això cada cop es troba més a faltar en la societat d'avui en dia. Sou persones meravelloses i és un plaer poder dir que sóc el vostre amic. Per part meua, no penso perdre el contacte amb vosaltres per res del món i volia dir-vos que sempre tindreu una casa on jo hi sigui, us estimo molt companys, gràcies per omplir la meua vida i el laboratori de riures i bon rotllo! Per últim, també m'agradaria donar les gràcies a en Joan Serrano ja que, només hem pogut treballar junts durant el final d'aquesta aventura, però ha estat un plaer poder formar aquest bon equip. Et desitjo molta sort en el desenvolupament de la teua Tesi que tot just acaba de començar!

D'altra banda, m'agradaria fer una menció especial al Christopher, l'Ignasi i el Toni ja que sou uns tècnics estupends i unes persones increïbles. Moltes gràcies per tota l'ajuda rebuda però, sobretot, per sempre tenir un moment per xerrar de les nostres coses, desconnectar una estona i riure molt. Sou uns grans professionals amb un interior magnífic!

Si sortim de l'àmbit professional, m'agradaria donar les gràcies als meus amics més propers, faré un agraïment conjunt perquè sinó serà més llarg aquest apartat que la pròpia Tesi. Sales, Lluc, Berny, Jordi, David, Ricky, Markes, Zapata, Ainoa, Vir, Laura, Gavi. Als meus col·legues en general, gràcies per estar sempre al meu costat tant en els moments bons com en els moments no tant bons, ha estat una etapa de quatre anys molt dura, sobretot per coses que han passat fora del laboratori i no sé que hagués fet sense el vostre recolzament. Heu estat al meu costat sempre que us he necessitat i els moments de desconexió fent birretes amb tots vosaltres han estat imprescindibles per carregar piles i poder seguir endavant. Moltes gràcies a tots vosaltres per estar amb mi durant aquesta etapa de la meua vida i en etapes anteriors, només us puc dir que espero que seguiu formant part de la meua vida durant totes les etapes que estan per venir perquè a mi em tindreu sempre pel que us faci falta. Us estimo moltíssim a cadascú de vosaltres.

Finalment, m'agradaria acabar aquest bloc parlant de la meva ànima bessona, la meva companya de vida, la Lena, una persona impressionant tant per dins com per fora. Moltes gràcies per omplir els meus dies de llum quan tot era fosc i per tots els moments divertidíssims que passem junts, mai havia sentit aquesta connexió que tinc amb tu. Gràcies també per ensenyar-me el que és una relació de veritat, basada en la comunicació i la confiança i per ensenyar-me el que és estimar de veritat i de forma sana. Des de que vas aparèixer, sóc el nen més feliç del món i espero no perdre't mai ja que és la primera vegada que em veig construint una família i un futur amb algú. Sé que tu ets la persona indicada perquè quan et miro als ulls sento pau, complicitat, amor, respecte i confiança. Per primera vegada en la meua vida puc cridar a ple pulmó que estic enamorat i desitjo poder seguir sumant moments màgics al teu costat fins que siguem dos abuelitos. T'estimo com mai he estimat a ningú o, com diries tu, t'estimo des d'aquí a Hawaii.

1. INTRODUCCIÓ	17
1.1. Els receptors acoblats a proteïna G	17
1.1.1. Característiques generals	17
1.1.2. Estructura dels GPCR	17
1.1.3. Classificació dels GPCR	18
1.1.4. Vies de senyalització dels GPCR	19
1.1.5. Activació dels GPCR	21
1.2. Oligomerització de GPCR	23
1.2.1. Interacció entre GPCR	23
1.2.2. Tècniques experimentals de detecció d'oligòmers de GPCR	24
1.2.3. Conseqüències funcionals de la formació d'oligòmers de GPCR	26
1.2.4. Implicació funcional dels oligòmers de GPCR en patologies neurològiques	27
1.3. L'obesitat	28
1.4. La grelina	32
1.4.1. El receptor de grelina (GHS-R)	33
1.4.2. L'heteromerització del receptor de grelina	35
1.4.3. El rol de la grelina en l'obesitat	36
1.5. El Sistema Cannabinoide	37
1.5.1. El receptor de cannabinoides de tipus 1 (CB ₁ R)	40
1.5.2. El receptor de cannabinoides de tipus 2 (CB ₂ R)	41
1.5.3. L'heteromerització dels receptors CB ₁ i CB ₂	43
1.5.4. El rol dels cannabinoides en l'obesitat	44
1.6. Les malalties neurodegeneratives	45
1.6.1. La malaltia d'Alzheimer	48
1.6.1.1. Prevalença i incidència	48
1.6.1.2. Fisiopatologia	49
1.6.1.3. Tractaments actuals	50
1.6.2. L'Esclerosi Múltiple	52
1.6.2.1. Prevalença i incidència	52
1.6.2.2. Fisiopatologia	53
1.6.2.3. Tractaments actuals	54
1.7. Els receptors d'adenosina	56
1.7.1. El receptor d'adenosina A _{2A} R	59
1.7.2. El receptor d'adenosina A ₃ R	61
1.7.3. L'heteromerització dels receptors d'adenosina	63
1.7.4. Els receptors d'adenosina en la malaltia d'Alzheimer	65
1.7.5. Els receptors d'adenosina en l'Esclerosi Múltiple	66

2. OBJECTIUS	71
3. RESULTATS	73
3.0. Informe dels directors	75
3.1. <i>Ghrelin and cannabinoid functional interactions mediated by ghrelin/CB₁ receptor heteromers that are upregulated in the striatum from offspring of mice under a high-fat diet</i>	79
3.2. <i>Identification of the ghrelin and cannabinoid CB₂ receptor heteromer functionality and marked upregulation in striatal neurons from offspring of mice under a high-fat diet</i>	93
3.3. <i>Cannabidiol skews biased agonism at cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors with smaller effect in CB₁-CB₂ heteroreceptor complexes</i>	113
3.4. <i>Pharmacological data of cannabidiol- and cannabigerol-type phytocannabinoids acting on cannabinoid CB₁, CB₂ and CB₁/CB₂ heteromer receptors</i>	127
3.5. <i>Similarities and differences upon binding of naturally occurring Δ⁹-tetrahydrocannabinol-derivates to cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors</i>	141
3.6. <i>Adenosine A_{2A} and A₃ receptors are able to interact with each other. A further piece in the puzzle of adenosine receptor-mediated signaling</i>	155
3.7. <i>Expression of the adenosine A_{2A}-A₃ receptor heteromer in different brain regions and marked upregulation in the microglia of the transgenic APP_{Sw,Ind} Alzheimer's disease model</i>	171
3.8. <i>Potentiation of cannabinoid signaling in microglia by adenosine A_{2A} receptor antagonists</i>	189
3.9. Resultats Extra: "Els receptors d'adenosina A _{2A} i A ₃ són capaços d'interaccionar formant complexos tetramèrics que es troben sobreexpressats en seccions cerebrals de ratolins tractats amb cuprizona com a model animal d'Esclerosi Múltiple"	205
4. DISCUSSIÓ	211
5. CONCLUSIONS	225
6. BIBLIOGRAFIA	229
7. ANNEXOS	255

ABREVIATURES

A

A β	Pèptid β -amiloid
AC	Adenilat ciclasi
AD	<i>Alzheimer's Disease</i>
ADA	Adenosina Deaminasa
ADN	Àcid desoxiribonucleic
ADP	Adenosina difosfat
AEA	Anandamida
2-AG	2-araquidonilglicerol
AMPA	Àcid α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropioníc
AMPC	Monofosfat cíclic d'adenosina
APOE	Apolipoproteïna E
APP	Proteïna precursora amiloide
Arg	Arginina
ARN	Àcid ribonucleic
ARs	Receptors d'adenosina
A ₁ R	Receptor d'adenosina de tipus 1
A _{2A} R	Receptor d'adenosina de tipus 2A
A _{2B} R	Receptor d'adenosina de tipus 2B
A ₃ R	Receptor d'adenosina de tipus 3
ATP	Adenosina trifosfat

B

β -AR	Receptor β -adrenèrgic
BHE	Barrera hematoencefàlica
BiFC	<i>Bimolecular Fluorescence Complementation</i>
BRET	<i>Bioluminescence Resonance Energy Transfer</i>

C

Ca ²⁺	Calci
CB ₁ R	Receptor de cannabinoides de tipus 1
CB ₂ R	Receptor de cannabinoides de tipus 2
CBD	Cannabidiol
CBDA	Cannabidiol àcid
CBDV	Cannabidiol varínic
CBG	Cannabigerol
CBGA	Cannabigerol àcid
CBGV	Cannabigerol varínic
CBN	Cannabinol
CHO	Cèl·lules d'ovari de hámster xinès
CNT	Transportador de nucleòsids concentratiu

D

Δ^9 -THC	Tetrahidrocannabinol
Δ^9 -THCA	Tetrahidrocannabinol àcid

Δ^9 -THCV	Tetrahidrocannabinol varínic
DAG	Diacilglicerol
DAGL α	Diacilglicerol lipasa
DMR	<i>Dynamic mass redistribution</i>
D ₁ R	Receptor de dopamina de tipus 1
D ₂ R	Receptor de dopamina de tipus 2
D ₃ R	Receptor de dopamina de tipus 3
E	
EAE	Encefalomielitis
EC ₅₀	Concentració efectiva mitjana màxima
EM	Esclerosi Múltiple
EMSP	Esclerosi Múltiple Secundària Progressiva
ENT	Transportador de nucleòsids equilibrador
ERK1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>
F	
FAAH	<i>Fatty acid amide hydrolase</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FRET	<i>Förster Resonance Energy Transfer</i>
G	
GA	Acetat de glatiramer
GDP	Guanosina difosfat
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
GFP ²	<i>Green Fluorescent Protein 2</i>
GHS-R	<i>Growth hormone secretagogue receptor</i>
GluR	Receptors metabotròpics de glutamat
GLUT4	<i>Glucose transport 4</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i>
GPR7	<i>G-protein coupled receptor 7</i>
GRKs	<i>G-protein coupled receptor kinases</i>
GTP	Guanosina trifosfat
H	
HEK-293T	Cèl·lules embrionàries de ronyó humà
HIF3	<i>Hypoxia-inducible factor 3</i>
5-HT _{2A}	Receptor de serotonina de tipus 2A
HTRF	<i>Homogeneous Time Resolved Fluorescence</i>
I	
IC ₅₀	Concentració inhibidora mitjana màxima
IFN- β	Interferó beta
IFN- γ	Interferó gamma
IGF2	<i>Insulin growth factor 2</i>
IL	Interleuquina

IMC	Índex de massa corporal
iNOS	Òxid nítric sintasa
IP3	Inositol trifosfat
IRS1	<i>Insulin receptor substrate 1</i>
K	
K ⁺	Potassi
KOR	Receptor d'opioides kappa
L	
LPS	Lipopolisacàrid
M	
MAGL	<i>Monoacylglycerol Lipase</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
MC ₄ R	<i>Melanocortin 4 receptor</i>
μM	Micromolar
MOR	Receptor d'opioides de tipus μ
MRI	Ressonància magnètica per imatges
N	
Na ⁺	Sodi
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleòtid
NADA	N-araquidonil dopamina
NAPE-PLD	<i>N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D</i>
NF-κβ	Factor nuclear kappa beta
nM	Nanomolar
NMDA	N-metil-D-aspartat
NO	Òxid nítric
O	
OTR	Receptor d'oxitocina
OX ₁ R	Receptor d'orexina de tipus 1
OX ₂ R	Receptor d'orexina de tipus 2
P	
PD	<i>Parkinson's disease</i>
PET	Tomografia d'emissió de positrons
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
PKA	Proteïna quinasa A
PKC	Proteïna quinasa C
PLA	Assaig de lligació per proximitat
PLCβ	Fosfolipasa Cβ
PS1	<i>Presenelin-1</i>
PS2	<i>Presenelin-2</i>

R

R	Receptor
Rluc	<i>Renilla luciferase</i>
RMN	Ressonància magnètica nuclear
ROS	Espècie reactiva d'oxigen

S

SNC	Sistema Nerviós Central
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SRET	BRET-FRET seqüencials
STT5	Receptor de somastatina de tipus 5

T

TM	Transmembrana
TNF- α	Factor de necrosi tumoral α

V

VTA	Àrea tegmental ventral
-----	------------------------

W

WT	<i>Wild-type</i>
----	------------------

Y

YFP	<i>Yellow Fluorescence Protein</i>
-----	------------------------------------

A large flock of birds, depicted as black silhouettes, is arranged in a circular pattern around the central text. The birds are flying in a clockwise direction, creating a sense of movement and unity. The word "INTRODUCCIÓ" is written in a bold, black, sans-serif font, centered within the circle. The background is a light, neutral color, which makes the dark silhouettes and text stand out prominently.

INTRODUCCIÓ

1.1. Els receptors acoblats a proteïna G

1.1.1. Característiques generals

Els receptors acoblats a proteïna G (GPCR), també anomenats com receptors de set dominis transmembrana (7TM), constitueixen el major i més versàtil grup de receptors de superfície cel·lular implicats en la transducció de senyal¹. Al voltant del 2% del genoma humà codifica per aquests GPCR^{2,3} donant lloc a més de 1000 proteïnes de les quals més del 90% s'expressen a nivell del Sistema Nerviós Central (SNC)⁴ conformant així la major superfamília de proteïnes de l'organisme⁵. Tal i com el seu nom indica, quan els GPCR són activats mitjançant un lligand específic, produeixen la transducció del senyal acoblant proteïna G. Els GPCR poden trobar-se expressats en pràcticament qualsevol organisme eucariota, inclosos insectes⁶ i plantes⁷, indicant que es tracta de proteïnes d'origen ancestral. De fet, inclús en bacteris ha estat identificada una proteïna amb set dominis transmembrana sensible a la llum que s'anomena rodopsina bacteriana. No obstant, no està clar que aquesta proteïna comparteixi un origen comú amb els GPCR eucariotes, ja que no s'acobla a proteïna G i les seves seqüències manquen d'homologia⁸.

Els GPCR són activats per una gran varietat de lligands, tant endògens com exògens, entre els quals s'inclouen hormones, pèptids, aminoàcids, lípids, nucleòtids, ions i fotons de llum. Quan aquests receptors uneixen el lligand, inicien la transducció de senyal a través d'un gran nombre d'efectors com són l'adenilat ciclasa, les fosfolipases o els canals iònics, entre d'altres, encarregant-se així, de moltes funcions en el SNC i perifèric, on regulen processos biològics com la proliferació, la supervivència cel·lular, el metabolisme, la diferenciació cel·lular, les respostes inflammatòries i immunològiques o la neurotransmissió^{9,10}. A més, són moltes les patologies presents en l'organisme humà que es troben associades a mutacions i polimorfismes d'aquests receptors, i és per això que els GPCR són diana d'un nombre cada vegada més elevat d'agents terapèutics. Aproximadament, s'estima que un 40% dels fàrmacs comercialitzats actualment i al voltant d'un 25% dels 200 fàrmacs més venuts avui en dia modulen l'activitat dels GPCR actuant com agonistes o antagonistes¹¹.

1.1.2. Estructura dels GPCR

Per tal que una proteïna sigui classificada com a GPCR cal que compleixi dues característiques. En primer lloc, aquesta proteïna ha d'estar constituïda per una única cadena proteica que sigui capaç de creuar set vegades la membrana plasmàtica. Per tant, haurà de presentar una estructura que contingui set seqüències de 25-35 residus aminoacídics amb un alt grau d'hidrofobicitat, constituint 7 hèlixs- α que travessen la membrana cel·lular. Aquestes hèlixs es troben connectades per tres *loops* intracel·lulars, quedant un domini amí terminal (N-terminal) orientat cap a l'espai extracel·lular i un domini carboxil terminal (C-terminal) orientat cap a l'espai intracel·lular, formant-se així una única unitat que permet que un lligand extracel·lular exerceixi el seu efecte específic dins la cèl·lula. La segona característica que ha de complir una proteïna per ser considerada com un GPCR és la capacitat d'acoblar proteïna G, de la qual es parlarà detalladament més endavant¹².

La primera estructura cristal·lina d'un GPCR va ser descrita l'any 2000, concretament, es va determinar l'estructura cristal·lina del receptor de rodopsina boví¹³. Un any més tard, es va publicar l'estructura cristal·lina d'aquest receptor de rodopsina acoblat a la proteïna G, fet que va permetre una millor interpretació dels canvis estructurals que poden patir els GPCR al acoblar-se a la proteïna G heterotrimèrica^{14,15}. Actualment, han estat descrites més de 100 estructures tridimensionals de GPCR; un nombre que no deixa de créixer gràcies a l'avenç tecnològic dels últims anys^{16,17}. La caracterització de l'estructura d'un GPCR permet el disseny de nous agonistes i antagonistes per aquest receptor¹⁸. Aquestes noves perspectives referents al coneixement estructural dels GPCR han obert un gran ventall de possibilitats en la recerca de nous agents terapèutics¹⁹.

1.1.3. Classificació dels GPCR

Encara que els receptors acoblats a proteïna G no comparteixen una gran homologia en la seva seqüència d'aminoàcids, es poden classificar segons diferents sistemes i característiques. El sistema de Kolakowski és el més utilitzat actualment i es basa en la classificació dels GPCR segons la seva estructura i característiques genètiques en 6 famílies (A-F)⁷.

La família A, també coneguda com *rhodopsin-like*, conté el 90% de tots els GPCR i és la més estudiada. L'homologia entre aquest tipus de receptors és molt baixa, es troba limitada a un únic residu conservat que correspon a l'arginina del motiu Asp-Arg-Tyr (DRY) del tercer domini transmembrana²⁰ i a la formació d'un pont disulfur que connecta el primer i el segon *loop* extracel·lulars. A més, molts receptors d'aquesta família tenen una cisteïna palmitolada en l'extrem C-terminal que serveix d'ancoratge a la membrana plasmàtica. En aquesta família de GPCR, la unió del lligand es produeix majoritàriament en una cavitat formada pels dominis transmembrana, encara que en alguns GPCR el reconeixement es produeix en els *loops* extracel·lulars i el domini N-terminal, com és el cas de la unió de petits pèptids^{2,4}.

La família B inclou un grup d'aproximadament uns 50 GPCR diferents, que uneixen una varietat d'hormones peptídiques i neuropèptids. Aquesta família es caracteritza per tenir un extrem N-terminal llarg (d'uns 100 residus) que conté diverses cisteïnes formant una xarxa de ponts disulfur²¹. Aquests receptors presenten una morfologia similar a la família A, però no es troben palmitolats i els residus conservats són diferents. D'altra banda, la família C es caracteritza per tenir els extrems N i C terminals força llargs (d'uns 500-600 aminoàcids) i una característica única d'aquests receptors és que contenen un tercer *loop* intracel·lular curt i altament conservat²². L'estructura del lloc d'unió del lligand ha estat deduïda mitjançant estudis de cristal·lografia de l'extrem N-terminal del receptor metabotròpic de glutamat solubilitzat. Excepte per les dues cisteïnes conservades en els *loops* extracel·lulars 1 i 2, que formen un pont disulfur implicat en la unió a lligand, aquesta família no té cap característica en comú amb les famílies A i B.

Les famílies D i E són les més petites en nombre de receptors i estan formades per receptors de feromones de llevat. Finalment, quatre receptors del segon missatger AMP cíclic constitueixen la família F, que és la més petita però única, ja que no presenta cap característica comuna amb les altres famílies de receptors⁷.

El sistema de classificació de Kolakowski és el que es troba més àmpliament acceptat, però el fet d'haver-se realitzat un estudi filogenètic de tota la superfamília de GPCR en el genoma de mamífers, ha donat lloc a una nova classificació més precisa. Aquesta nova classificació divideix els GPCR humans en cinc famílies principals: *Glutamate*, *Rhodopsin*, *Adhesion*, *Frizzled/Tasted2* i *Secretin*. Aquesta nova classificació rep el nom de GRAFS degut a les inicials dels diversos grups que la conformen. Els grups *Rhodopsin*, *Secretin* i *Glutamate* es corresponen amb la classificació A-F ja que es tracta de les famílies A, B i C respectivament, mentre que els altres dos grups (*Adhesion* i *Frizzled/Tasted2*) no mantenen cap relació amb la classificació A-F. Els autors d'aquesta nova classificació defensen la teoria de que els receptors acoblats a proteïna G van sorgir a partir d'un antecessor comú, el qual va anar evolucionant mitjançant duplicacions gèniques, des de la major simplicitat que presentava en els seus orígens fins a l'enorme complexitat que ens mostra aquesta superfamília de GPCR en l'actualitat. La gran diversitat que conté aquesta superfamília de proteïnes de membrana ens demostra la gran complexitat fisiològica que tenen en els organismes vius²³.

1.1.4. Vies de senyalització dels GPCR

Els receptors acoblats a proteïna G deuen el seu nom a l'habilitat que tenen per reclutar, interaccionar i regular la funció de la proteïna G. Aquesta proteïna G és heterotrimèrica i, per tant, està constituïda per les subunitats α (39-46 kDa), β (37 kDa) i γ (8 kDa). Quan es produeix la unió del lligand al receptor, s'evidencien canvis conformacionals que es transmeten des del receptor fins la proteïna G. És en aquest moment quan el receptor actua com un *guanine nucleotide exchange factor* (GEF), provocant que la subunitat α de la proteïna G alliberi GDP i uneixi GTP²⁴. Per tant, és aquest intercanvi de GDP per GTP el que desestabilitza el trímer, provocant un canvi estructural entre la subunitat α i el dímer β/γ . Seguidament, tant la subunitat α com el dímer β/γ actuaran com a molècules capaces d'interactuar i modular, activant o inhibint, una àmplia varietat de segons missatgers. La transducció del senyal acaba quan l'activitat intrínseca GTPasa de la subunitat α de la proteïna G hidrolitza el GTP a GDP i fosfat²⁵. D'altra banda, la senyalització mediada pel dímer β/γ finalitza amb la reestructuració de la proteïna G quan el receptor ha produït el seu efecte²⁴.

Existeixen quatre tipus de subunitats α en mamífers, que es caracteritzen per la seva estructura primària i per la cascada de senyalització que activen²⁶. En el cas de les subunitats α_s o α_i , la proteïna efectora és l'adenilat ciclasa (AC). No obstant, ambdues subunitats presenten senyalitzacions antagòniques ja que la subunitat α_s estimula l'adenilat ciclasa mentre que la subunitat α_i la inhibeix. L'adenilat ciclasa és un enzim que catalitza la conversió d'ATP a AMPc (un important segon missatger cel·lular) i aquest AMPc actuarà activant la proteïna quinasa A (PKA), que s'encarrega de fosforilar diverses proteïnes, entre elles receptors, canals iònics, enzims o factors de transcripció, regulant així la seva activitat i, conseqüentment, el funcionament de la cèl·lula.

D'altra banda, la subunitat $\alpha_{q/11}$ activa la fosfolipasa C β (PLC β), enzim que hidrolitza fosfatidil inositol bifosfat (IP $_2$) generant fosfatidil inositol trifosfat (IP $_3$) i diacilglicerol (DAG), compostos capaços d'augmentar els nivells de calci intracel·lulars. Per últim, la subunitat $\alpha_{12/13}$ s'encarrega de regular les proteïnes Rho en ser activada (Figura 1)²⁷.

Moltes de les respostes mediades pels GPCR no consisteixen únicament en l'estimulació de segons missatgers convencionals, sinó que són el resultat de la integració de diverses vies de senyalització. Un clar exemple és la via de les MAPK. L'activació de la ruta de les MAPK a través d'un GPCR depèn principalment del dímer β/γ de la proteïna G²⁸. Concretament, l'activació de les MAPK es realitza per la via Ras, Raf, MEK i ERK. El procés és iniciat per l'activació de les subunitats β/γ , donant lloc al reclutament de Sos cap a la membrana, activant així, l'intercanvi de GDP per GTP en la proteïna Ras. Aquesta proteïna Ras acabarà la cascada de senyalització fosforilant les ERK1/2⁹. Concretament, l'activació de les ERK1/2 requereix de la fosforilació de dos residus treonina i serina separats per un sol aminoàcid. Aquesta activació/fosforilació de les ERK1/2 fa que puguin passar del citoplasma al nucli per tal de fosforilar i activar altres quinases i diversos factors de transcripció, activant l'expressió gènica²⁹.

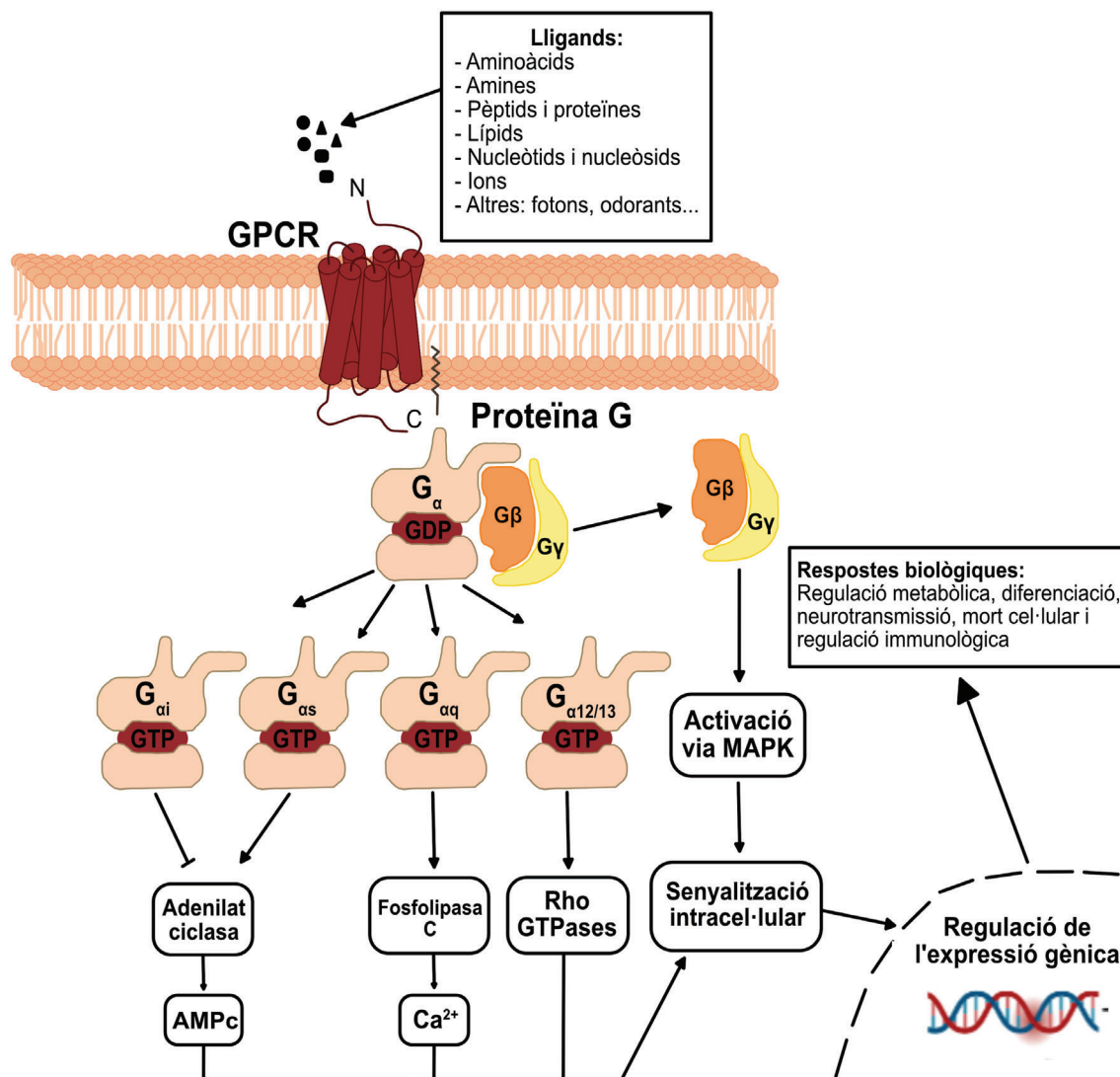


Figura 1: Senyalització intracel·lular de les proteïnes G α més importants.

Cal destacar que la senyalització dels GPCR és realment complexa, ja que també poden realitzar un efecte sense acoblar proteïna G. Un exemple de via independent a proteïna G podria ser el reclutament de β -arrestines, ja que, al llarg de les dues últimes dècades, s'ha demostrat l'habilitat de les β -arrestines per realitzar transducció de senyal de manera independent a la proteïna G³⁰. A més, s'ha descrit que aquestes β -arrestines poden actuar com a proteïnes *scaffolding* de diversos components de la via de senyalització de les ERKs, aproximant-los i facilitant així l'activació d'aquesta via³¹. El reclutament de β -arrestines és un dels principals mecanismes per dessensibilitzar els GPCR un cop han produït la seva acció, internalitzant-los i reduint així la disponibilitat del receptor en la membrana plasmàtica i la seva capacitat d'unir lligand i transduir senyals³². D'aquesta manera, la cèl·lula es protegeix davant d'estímuls exagerats.

1.1.5. Activació dels GPCR

Existeixen una gran varietat de compostos capaços d'unir-se als GPCR. Aquests compostos es podran unir al receptor en el seu centre ortostèric o principal i/o en el seu centre al·lostèric o modulador³³. Els compostos capaços d'unir-se al centre ortostèric activant el GPCR s'anomenen agonistes mentre que els lligands que bloquegen el receptor s'anomenen antagonistes. Els agonistes poden ser totals o parcials, segons la seva eficàcia al promoure una resposta bioquímica en el receptor. En el centre ortostèric també s'uneixen els agonistes inversos, que són capaços d'activar el receptor d'una manera antagònica a com ho farien els agonistes totals o parcials i també inhibeixen la resposta basal que presenta el receptor en absència de lligand. D'altra banda, els compostos que s'uneixen al centre al·lostèric del receptor actuaran com a moduladors. Poden ser positius o negatius, augmentant o disminuint, respectivament, l'efecte d'un agonista sobre el propi receptor. També s'han descrit compostos capaços d'unir-se al centre al·lostèric però incapaços de modificar la senyalització del receptor, compostos que reben el nom de moduladors al·lostèrics neutres que presenten la funció estabilitzadora d'evitar que s'uneixin altres moduladors al·lostèrics³⁴. És important tenir en compte que en l'actualitat encara existeixen GPCR pels quals encara no s'ha identificat el seu lligand endogen. Aquests receptors s'anomenen receptors orfes.

El concepte de selectivitat funcional o agonisme esbiaixat (*biased agonism*) fou introduït inicialment per Kenakin l'any 2009³⁵, però no s'ha analitzat profundament fins fa pocs anys. Aquest fenomen es basa en com un lligand activa una senyalització específica en un GPCR per sobre de qualsevol altre. Per tant, el lligand que desencadena aquesta resposta específica, estabilitza una de les conformacions del receptor de les diverses que pot induir un lligand³⁶. La bibliografia descriu la selectivitat funcional a diversos nivells; per un costat, es pot considerar l'agonisme esbiaixat d'un lligand a nivell de la senyalització dependent o independent de proteïna G, afavorint una via de senyalització per sobre d'altres^{37,38} però també existeix selectivitat funcional en quant a l'acoblament dels GPCR a diferents proteïnes G heterotrimèriques, ja que alguns receptors són capaços d'acoblar-se a més d'un tipus de subunitat α ³⁹.

L'agonisme esbiaixat és un fenomen que té una gran rellevància i s'utilitza actualment en el disseny de nous fàrmacs o inclús en la millora de l'eficàcia i la reducció d'efectes adversos en fàrmacs ja existents, activant o inhibint específicament la via de senyalització terapèutica o causant de la malaltia (Figura 2)⁴⁰. En aquest sentit, un lligand amb selectivitat funcional pot esdevenir més interessant que un altre que activi o bloquegi de manera equilibrada totes les vies de senyalització mediatades pel receptor diana⁴¹.

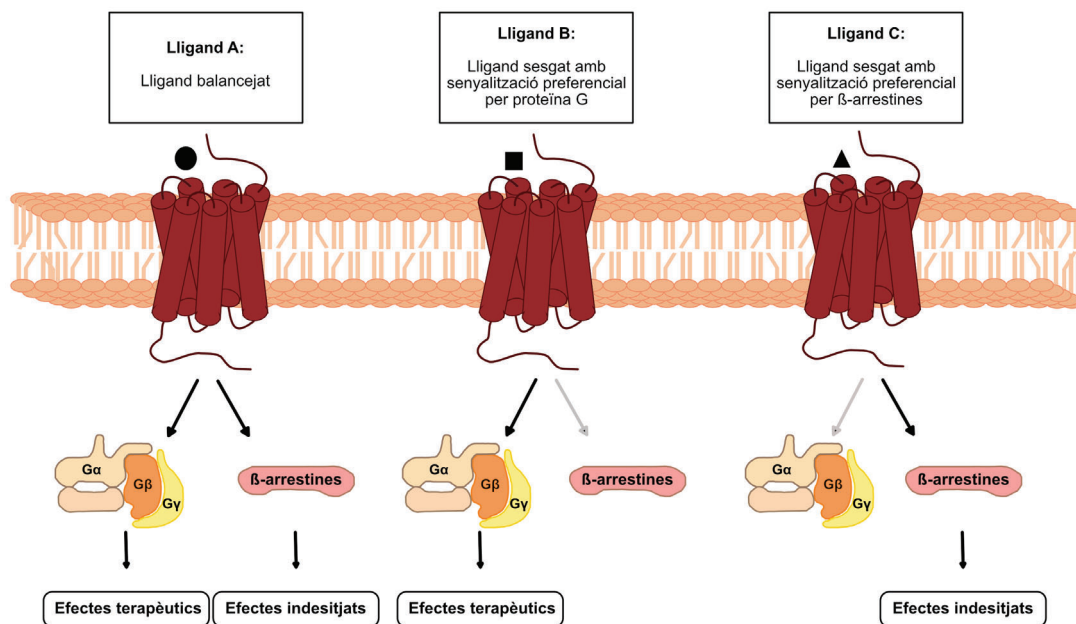


Figura 2: Selectivitat funcional dels GPCR.

Actualment, existeixen diferents mètodes per a la quantificació de l'agonisme esbiaixat d'un lligand específic sobre un receptor determinat, però el més conegut i acceptat és el *bias factor*³⁶. Per al seu càlcul necessitem dos valors: el valor d'efecte màxim (r) i la K_A que s'obté aplicant l'antilogaritme de la concentració mitjana efectiva (EC_{50}) o de la concentració mitjana inhibidora (IC_{50}), depenent de si el lligand d'interès actua activant o bloquejant la via de senyalització estudiada. És important escollir un lligand i una via de senyalització de referència que habitualment seran el lligand endogen i la via de senyalització principal del receptor d'interès. Tenint en compte tota aquesta informació, el *bias factor* es calcula aplicant la següent fórmula matemàtica, on j_1 és la via de senyalització d'estudi i j_2 és la via de senyalització de referència⁴².

$$\log \text{bias} = \Delta \log(r/K_A)_{j_1} - \Delta \log(r/K_A)_{j_2}$$

$$\text{bias} = 10^{\Delta \log(r/K_A)_{j_1-j_2}}$$

Un *bias factor* superior a 1 ens indica que el lligand d'estudi té una major preferència a senyalitzar per una determinada via que el lligand de referència. Pel contrari, un valor inferior a 1 ens indicarà el contrari.

En definitiva, el concepte de selectivitat funcional i la seva quantificació es presenten com a grans eines a considerar per a la caracterització de lligands nous o ja existents, amb la finalitat d'avaluar de manera precisa la resposta que desencadenen sobre un receptor en concret.

1.2. Oligomerització de GPCR

1.2.1. Interacció entre GPCR

Tradicionalment, els mecanismes d'unió a lligand i transducció de senyal induïts pels receptors acoblats a proteïna G consideraven aquests receptors com a unitats monomèriques o proteïnes independents. No obstant, a mitjans dels anys 90, diversos estudis van demostrar que aquests receptors no actuen de manera independent, sinó que eren capaços d'interaccionar entre ells, adquirint així noves propietats funcionals i diferents mecanismes de regulació. En aquell moment, hi havia certes evidències farmacològiques, com per exemple, corbes complexes d'unió a lligand, que només podien ser interpretades amb la formació de complexos dimèrics o multimèrics entre diferents GPCR⁴³. Van ser Maggio i els seus col·laboradors els que, mitjançant assajos de complementació i co-immunoprecipitació, van determinar la formació d'heterodímers entre els receptors $\alpha 2$ -adrenèrgics i els M3 muscarínics⁴⁴.

El fenomen d'oligomerització entre GPCR engloba tant la homodimerització, que s'entén com l'associació física entre dos receptors idèntics, com la heterodimerització, en la que es produeix l'associació entre dos receptors amb propietats diferents. A més, aquesta associació es pot produir entre monòmers, formant dímers de receptors, però també es pot produir entre dímers o estructures d'ordre superior, formant tetràmers o oligòmers (Figura 3). En un inici, les tècniques de detecció d'oligòmers eren limitades i només es parlava de la formació de dímers. Però, actualment, gràcies als avenços experimentals, és possible determinar l'estructura de complexos oligomèrics de manera més precisa, demostrant així la formació de trímers, tetràmers o complexos d'ordre superior⁴⁵⁻⁴⁷.

L'oligomerització de GPCR és un fenomen que produeix un seguit de canvis conformacionals en els receptors afectant diversos aspectes funcionals tals com la ontogènia, la transducció de senyal, la farmacologia, la internalització o, inclús, la unió de lligand^{48,49}. És més, s'ha descrit que aquests GPCR poden constituir un nivell superior d'organització en el que els homo- o heterodímers interaccionin entre si donant lloc a la formació de complexos supramoleculars constituïts per oligòmers de receptors que poden acoblar més d'una proteïna G^{50,51}.

L'oligomerització de GPCR ha fet aparèixer una seria problemàtica a nivell farmacològic, ja que la majoria de fàrmacs que tenen com a diana un GPCR, han estat dissenyats partint de la base que aquests receptors actuen de manera individual. Vist des d'una nova perspectiva, el fet que aquests receptors formin complexos oligomèrics ha afegit una nova dimensió en el disseny de nous fàrmacs i, a la vegada, ha fet replantejar-se seriosament la validesa d'alguns d'ells⁵².

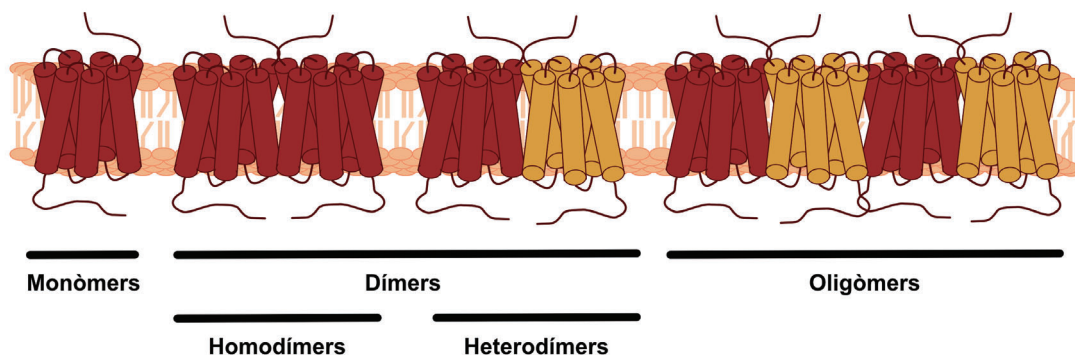


Figura 3: Oligomerització de GPCR.

1.2.2. Tècniques experimentals de detecció d'oligòmers de GPCR

La detecció i demostració de la formació d'oligòmers de GPCR sempre ha estat lligada a l'evolució i perfeccionament de nombroses tècniques experimentals, entre les quals s'inclouen:

- La Co-immunoprecipitació: va ser la tècnica més utilitzada inicialment, amb ella es van determinar complexos oligomèrics com la formació d'homodímers entre els receptors β 2-adrenèrgics⁵³, δ -opioides⁵⁴, receptors metabotrópics mGlu₅R⁵⁵ i receptors de serotonina 5-HT_{2c}⁵⁶, entre d'altres. Es tracta d'una tècnica que ha tingut un paper molt important en la detecció d'interaccions proteïna-proteïna, però que actualment ha perdut un pes important, degut a un gran inconvenient: la formació de dímers artefactuals al utilitzar detergents per solubilitzar aquestes proteïnes, ja que són majoritàriament de naturalesa hidrofòbica.

- Transferència d'Energia Ressonant per Bioluminescència (BRET): aquesta tècnica demostra la interacció entre dues proteïnes mitjançant l'ús de proteïnes de fusió. La tècnica requereix d'un receptor fusionat a la proteïna luminescent *Renilla luciferase*, que actuarà com a donadora, i l'altre receptor fusionat a la proteïna fluorescent verda (GFP) o groga (YFP), que actuaran com acceptores. D'aquesta manera, si els dos receptors d'estudi es troben interaccionant (distància entre ells inferior a 10 nm), al tractar les cèl·lules vives amb el substrat de la *Renilla luciferase*, la *coelenterazine H*, l'enzim catalitzarà l'oxidació d'aquest compost emetent bioluminescència que es transferirà de la proteïna donadora a l'acceptora, i aquesta última emetrà a una longitud d'ona coneguda, demostrant-se així la interacció física entre ambdós receptors (Figura 4)⁵⁷.

- Transferència d'Energia Ressonant per Fluorescència (FRET): es tracta d'una tècnica amb les mateixes bases moleculars que el BRET però en aquest cas no es fa servir la *Renilla luciferase* com a proteïna donadora sinó que es fa servir una altra proteïna fluorescent, de manera que si els dos receptors es troben interaccionant, els espectres d'emissió de les proteïnes fluorescentes donadora i acceptora es solaparan i s'obtiniran dos pics d'emissió⁵⁸.

- Transferència d'Energia Ressonant Seqüencial (SRET): aquesta tècnica permet la detecció d'heteròmers formats per tres proteïnes, en cèl·lules vives, mitjançant la combinació de les tècniques de BRET i FRET. El primer receptor d'estudi es troba fusionat a la *Renilla luciferase* i, al produir-se l'oxidació del substrat *coelenterazine H*, actuarà com a proteïna donadora excitant el fluorocrom al que està fusionat el segon receptor d'estudi que, en excitar-se, emetrà a una longitud d'ona capaç d'excitar el fluorocrom al que està fusionat el tercer receptor d'estudi. Els fluorocroms als quals estan fusionats el segon i tercer receptor d'estudi són, majoritàriament, les proteïnes fluorescentes verda (GFP) i groga (YFP)⁵⁹.

- Assaig de Lligació per Proximitat (PLA): aquesta tècnica és l'única que ens permet detectar interaccions físiques entre receptors en cultius primaris i teixit, sense necessitat de transfecció. Consisteix en marcar els receptors d'interès mitjançant anticossos primaris específics que seran reconeguts per anticossos secundaris conjugats a dues sondes d'oligonucleòtids complementàries a una tercera sonda d'ADN circular que es subministra amb el kit comercial. Si ambdós receptors es troben interaccionant (distància inferior a 30 nm), després d'una incubació amb una lligasa i una polimerasa, les dues sondes d'oligonucleòtids seran capaces d'hibridar i amplificar-se, essent detectades fàcilment al microscopi confocal com a clústers de coloració vermella sobre nuclis blaus tenyits amb Hoechst (Figura 4)⁶⁰.

- Complementació Bimolecular (BiFC): aquesta tècnica es basa en la fusió dels receptors d'interès a dues meitats (hemiproteïnes) no fluorescentes de la proteïna YFP (nYFP i cYFP). De manera que, quan ambdós receptors es troben interaccionant, les dues hemiproteïnes seran capaces de reconstruir la proteïna YFP, emetent a una longitud d'ona característica. La combinació d'aquesta tècnica amb altres tècniques com el BRET i/o el FRET permet detectar oligòmers de GPCR d'ordre superior⁶¹. A més, es poden fer servir pèptids anàlegs als dominis transmembrana dels receptors d'interès per tal de determinar d'una manera molt concreta quins són els dominis transmembrana específics implicats en la interacció entre ambdós receptors⁶².

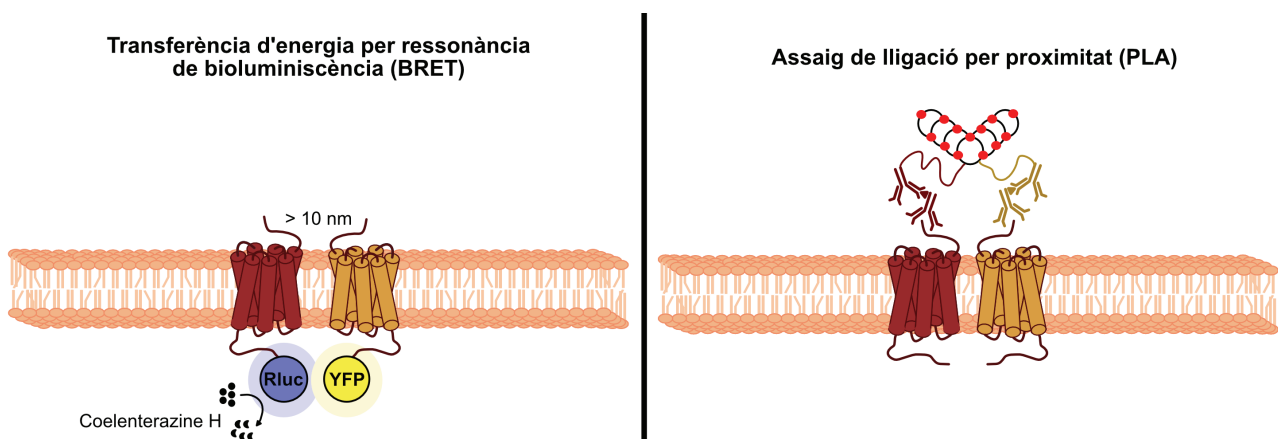


Figura 4: Representació gràfica de les tècniques experimentals de BRET i PLA.

1.2.3. Conseqüències funcionals de la formació d'oligòmers de GPCR

El fenomen d'oligomerització es troba implicat en la regulació de la funcionalitat del receptor a diferents nivells, des de la modulació de l'expressió del receptor a la superfície cel·lular fins al fet de conferir noves propietats farmacològiques als receptors que formen part del complex heteromèric. De fet, ha estat àmpliament descrit que l'oligomerització confereix una gran diversitat farmacològica ja que, per exemple, la unió d'un lligand a un receptor que forma part d'un dímer pot influir en la unió d'un altre lligand al segon receptor del dímer^{63,64}. A més, l'oligomerització també pot modificar les propietats de senyalització d'un determinat lligand afectant a la selectivitat d'acoblament entre el receptor corresponent i la seva proteïna G, resultant així en una potenciació, atenuació o acoblament amb una altra proteïna G⁶⁵. La formació d'oligòmers també pot influir en la diversitat farmacològica, és a dir, un lligand pot augmentar o perdre afinitat per unir-se a un receptor depenent del complex on es trobi. Per tant, el fenomen d'oligomerització ha proporcionat una nova perspectiva en el disseny de fàrmacs que actuen a través d'aquests complexos ja que és important tenir en compte que les propietats funcionals dels receptors individuals canvien dins del context heteromèric. Aquesta funcionalitat nova que mostren els receptors quan es troben formant complex s'anomena "*oligomer fingerprint*" i es basa en processos com la cooperativitat positiva o *cross-talk* positiu, en la que veiem com l'activació d'un receptor produeix una potenciació de la funcionalitat del receptor veí, la cooperativitat negativa o *cross-talk* negatiu, en la que veiem com l'activació d'un receptor produeix una disminució de la funcionalitat del receptor veí i, per últim, el fenomen de *cross-antagonisme* en el que veiem com el bloqueig d'un receptor amb el seu antagonista específic també produeix el bloqueig de la funcionalitat del receptor veí (Figura 5)⁶⁶.

El primer heteròmer descrit amb propietats diferents als receptors individuals fou l'heterodímer format pels receptors κ i δ -opioide⁶⁷. Aquest heterodímer no presenta gaire afinitat per lligands selectius dels receptors κ i δ -opioide. Això és degut a que, quan els receptors es troben formant part d'un complex heteromèric, perden la seva afinitat pels lligands específics però, en canvi, si que presenten una alta afinitat per lligands selectius parcials. L'heterodímer format pels receptors μ i δ -opioide també mostra propietats funcionals pròpies, ja que el tractament amb l'antagonista específic d'un dels receptors produeix un increment en la funcionalitat del receptor veí. En la mateixa línia, el tractament amb ambdós agonistes específics conjuntament, dona lloc a una potenciació sinèrgica de la transducció del senyal⁶⁸.

D'altra banda, ha estat demostrat que la unió d'un lligand a un receptor que es troba en un complex heteromèric, pot afectar a la unió d'un altre lligand al receptor veí, apareixent doncs un mecanisme a través del qual un lligand pot modular l'eficàcia i/o potència d'un altre lligand del complex. Un exemple interessant podria ser el dels receptors de dopamina i adenosina, entre els quals ha estat descrita una cooperativitat negativa ja que els agonistes del receptor A_1 inhibeixen la unió dels agonistes del receptor D_1 en l'heterodímer A_1R-D_1R i, l'estimulació del receptor A_{2A} en l'heterodímer $A_{2A}R-D_2R$, desemboca en una reducció de l'afinitat dels agonistes del receptor D_2 , a la vegada que es veu afectat l'acoblament a la proteïna G i la transducció del senyal del receptor dopaminèrgic⁶⁹.

Paral·lelament, en l'heteròmer format pels receptors A_{2A} i CB_1 passa el mateix, ja que l'activació del receptor A_{2A} , disminueix l'activitat del receptor CB_1 ⁷⁰. Un altre exemple podria ser l'heterodímer format pels receptors A_{2A} i A_1 d'adenosina, on veiem que l'estimulació del receptor A_{2A} disminueix molt considerablement l'afinitat del receptor A_1 pel seu agonista i s'inhibeix així la seva senyalització⁷¹.

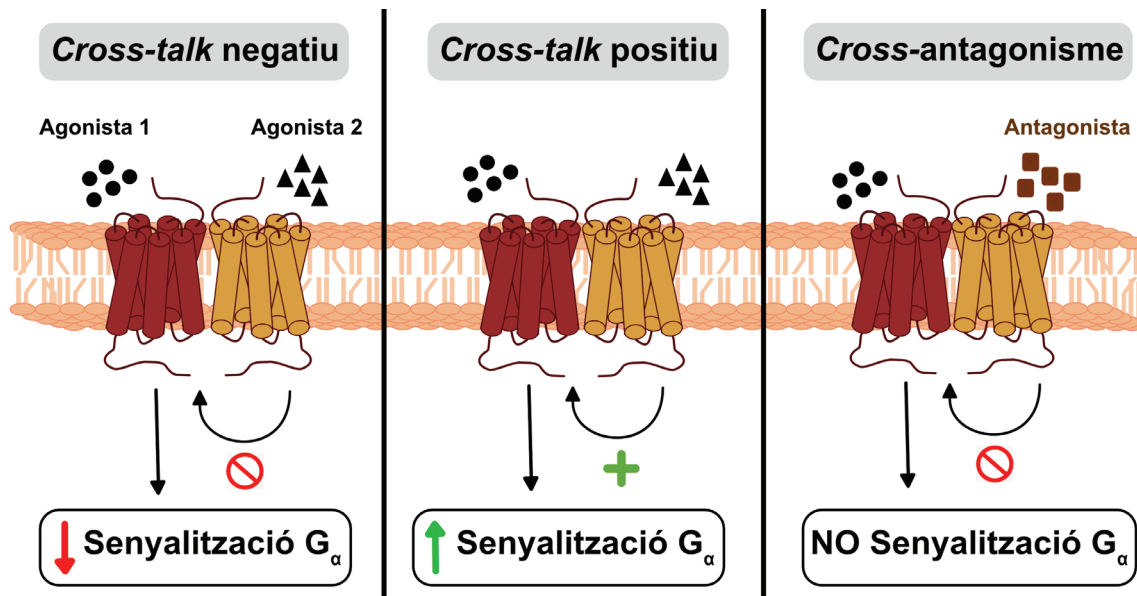


Figura 5: Dibuix esquemàtic dels fenòmens de *cross-talk* negatiu, *cross-talk* positiu i *cross-antagonisme*.

Una nova característica de la formació d'oligòmers de GPCR és la possibilitat que es produeixi un canvi d'acoblament a proteïna G. Va ser a l'any 2004 quan es va demostrar per primera vegada que els receptors de dopamina D_1 i D_2 podien formar heteròmers en cèl·lules transfectades⁷². El receptor D_1 és capaç d'acoblar proteïna G_s mentre que el receptor D_2 acobla proteïna G_i , però quan ambdós receptors es troben formant un heteròmer, s'acoblen a una proteïna diferent, una proteïna G_q . Per tant, l'activació dels receptors dopaminèrgics D_1 i D_2 en l'heteròmer no induïx una transducció del senyal via AMPc sinó que es produeix una mobilització del calci intracel·lular^{62,73}.

1.2.4. Implicació funcional dels oligòmers de GPCR en patologies neurològiques

La família dels receptors de GPCR engloba uns 850 membres, 350 dels quals són dianes terapèutiques potencials. El fet que l'oligomerització de GPCR confereixi nous perfils de senyalització i l'aparició del concepte "*oligomer fingerprint*" ha provocat que s'obrin noves fronteres i línies d'investigació en el desenvolupament de fàrmacs que actuen sobre aquests oligòmers⁷⁴. Actualment, existeixen diversos dímers de GPCR descrits en la literatura que presenten un paper rellevant en diverses patologies. Un exemple clar seria el dímer $A_{2A}R$ - D_2R , que es troba en l'estriat dels mamífers i presenta un rol crucial en la regulació de patologies neurodegeneratives severes tals com la malaltia de Parkinson. Ambdós receptors són capaços d'interaccionar de manera que es produeix un bloqueig de la senyalització del receptor dopaminèrgic D_2 per part del receptor d'adenosina A_{2A} i aquest bloqueig només es pot revertir en presència de l'antagonista específic del receptor A_{2A} , fet que permet obtenir efectes anti-parkinsonians davant

d'una co-administració d'agonistes del receptor D_2 amb antagonistes del receptor A_{2A} ^{75,76}. Per tant, el bloqueig del receptor A_{2A} per part d'un antagonista específic, permetrà un augment en la senyalització del receptor D_2 , produint-se així una millora de la transmissió dopaminèrgica que desembocarà en una contribució positiva en el tractament de la malaltia del Parkinson. A més, els antagonistes del receptor d'adenosina A_{2A} que han estat testats en assajos clínics han demostrat que són segurs per l'organisme humà, com és el cas de l'*istradefylline*⁷⁷.

S'han descrit altres complexos dopaminèrgics implicats en desordres neurològics tals com la depressió, l'esquizofrènia o l'addicció a substàncies d'abús, com podria ser l'heteròmer format pels receptors D_1 i D_2 , que va ser caracteritzat per primera vegada en l'estriat de rata^{78,79}. Un altre exemple és l'heteròmer format pels receptors D_1 i D_3 , on l'estimulació del receptor D_3 potencia l'efecte del receptor D_1 , afavorint la transmissió dopaminèrgica en els ganglis basals⁸⁰. D'altra banda, el complex A_1R - D_1R , es troba fortament implicat en l'addicció a la cocaïna, ja que aquesta substància d'abús és capaç d'interaccionar amb l'heteròmer bloquejant la interacció dels protòmers que en formen part i desfent el complex⁸¹. Cal tenir en compte que aquests heteròmers de GPCR també es troben implicats en la dependència al cànnabis ja que, per exemple, al unir-se el Δ^9 -tetrahidrocannabinol al receptor CB_1 , pot regular l'efecte del receptor de serotonina $5-HT_{2A}$ quan ambdós receptors estan formant un complex heteromèric^{82,83}.

Finalment, és important destacar que els heteròmers de GPCR han fet aparèixer noves estratègies farmacològiques per regular el pes corporal. El receptor MC_4R (*melanocortin 4 receptor*) és un dels GPCR més importants implicats en la regulació del pes i el control de la ingesta. Se sap que les seves mutacions heterozigòtiques són la causa genètica principal d'obesitat en humans⁸⁴. Aquest receptor MC_4R és capaç de formar homodímers i heterodímers amb altres GPCRs com el $GPR7$ (*G-protein coupled receptor 7*), que es troben fortament involucrats en la regulació del pes, indicant així que els complexos del receptor MC_4R poden ser grans dianes terapèutiques per als nous fàrmacs contra l'obesitat en humans⁸⁵⁻⁸⁸.

1.3. L'obesitat

L'obesitat és una malaltia multifactorial complexa que es basa en l'acumulació de greix corporal que acaba desembocant en efectes negatius en l'organisme de l'individu que la pateix. La causa principal de l'obesitat és una pèrdua del balanç energètic entre les calories consumides en l'alimentació i les calories cremades pel nostre organisme durant un període de temps llarg⁸⁹. L'obesitat és un fenomen global que es pot trobar en qualsevol indret del món, exceptuant algunes regions del sud-est asiàtic com Japó o Corea del Sud. És important tenir en compte que una persona es considera obesa quan el seu índex de massa corporal (IMC) és igual o superior a 30. Aquest índex de massa corporal o IMC es calcula dividint el pes d'un individu en quilograms entre el quadrat de l'alçada d'aquest individu en metres⁹⁰. El fet de patir obesitat incrementa, considerablement, el risc de patir altres patologies tals com la diabetis de tipus II, les malalties cardiovasculars, el síndrome metabòlic, la malaltia crònica dels ronyons, la hiperlipidèmia, la hipertensió, l'apnea obstructiva durant els períodes de son, l'osteoartritis, la depressió i, a més, alguns tipus de càncer⁹¹.

Així, l'obesitat no és només un problema per si mateix, sinó que pot desembocar en altres patologies realment greus.

Avui dia, estan descrits molts mecanismes a través dels quals es pot desenvolupar l'obesitat, però està acceptat que la causa principal és el fet que l'organisme acumuli més energia de la que és capaç de consumir. No obstant, estudis recents demostren que té més rellevància la qualitat nutricional dels aliments consumits que la pròpia quantitat d'aquests a l'hora de desenvolupar obesitat⁹². A més, existeixen diversos factors genètics que determinaran la predisposició dels individus per acumular greix i guanyar pes més fàcilment⁹³.

Epidemiològicament, l'obesitat es pot classificar en tres tipus en funció del seu grau de severitat. L'obesitat de tipus I la pateixen els individus que presenten un IMC d'entre 30 i 34,9 mentre que la de tipus II es mostra en individus amb un IMC d'entre 35 i 39,9 i la de tipus III en individus amb un IMC superior a 40 (Figura 6). L'obesitat de tipus III o obesitat mòrbida és la que presenta més risc a desenvolupar diverses patologies cardíaques i metabòliques i no es pot tractar únicament amb dieta i exercici sinó que s'han de fer servir estratègies més dràstiques com podria ser la cirurgia bariàtrica⁹⁴. És important destacar que la prevalença d'aquesta patologia s'ha doblat des de l'any 1980 i s'estima que un terç de la població global presenta uns IMC corresponents a organismes obesos o, com a mínim, amb sobrepès. La patogènesi de l'obesitat engloba diversos factors tals com el desgast calòric, l'exercici físic o la sensació de gana, però presenta interaccions complexes amb altres factors externs a l'individu com el seu estat socioeconòmic, factors hereditaris i ambientals o la disponibilitat d'un bon sistema sanitari⁹⁵. La història familiar dels individus també pot ser un factor determinant en el desenvolupament d'aquesta patologia, tant a nivell genètic/hereditari com a nivell d'estil de vida inculcat⁹⁶. Actualment, ens trobem davant d'un impactant màrqueting d'algunes grans empreses com la Coca-Cola o el McDonald's on es promou el consum de menjar i begudes altament ensucrades que modulen negativament el comportament humà i fan que la majoria de la població prefereixi consumir aquest tipus d'aliments que són tant densos calòricament. Està descrit que aquest tipus de "menjar brossa" amb percentatges molt elevats tant de greix com de sucre, poden estimular el cervell humà en les mateixes àrees que ho podrien fer substàncies d'abús com la cocaïna o la heroïna, estimulants el circuit de la recompensa del nostre cervell i generant una forta addicció⁹⁷.

ÍNDEX DE MASSA CORPORAL (IMC)

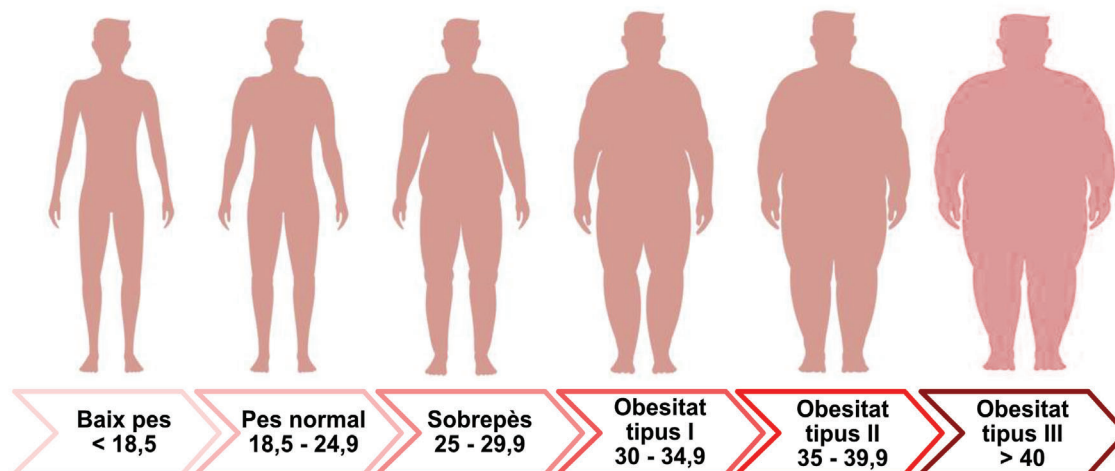


Figura 6: Representació gràfica dels diferents estadis d'índex de massa corporal.

Fisiològicament, s'ha determinat que la flora intestinal dels individus també pot tenir un paper rellevant en el desenvolupament de l'obesitat. S'ha demostrat que variacions en el microbioma intestinal d'un individu causen alteracions directes en el metabolisme i el pes corporal de l'organisme hoste⁹⁸. Cal tenir en compte que el cos humà conté al voltant de $3,8 \times 10^{13}$ microorganismes, localitzats principalment al tracte gastrointestinal. Normalment, tots aquests microorganismes tenen funcions beneficioses i imprescindibles per a l'organisme hoste, com pot ser contribuir en el metabolisme de lípids i carbohidrats, en la síntesi de vitamines i aminoàcids, en la proliferació de cèl·lules epitelials, en la protecció front a patògens o en la modulació hormonal, però un desbalanç entre aquestes poblacions microbianes, procés que s'anomena disbiosi, pot provocar un seguit de patologies greus com inflamacions intestinals, malnutrició, diabetis, càncer, desordres neurològics o obesitat⁹⁹. Existeixen nombrosos estudis que demostren que les alteracions en el microbioma intestinal estan estretament relacionades amb l'aparició d'obesitat. De fet, en pacients amb obesitat i alteracions en el microbioma intestinal, s'ha descrit que els enzims implicats en el metabolisme de la glucosa s'expressen a nivells inferiors, fet que demostra que les alteracions del microbioma poden produir canvis fenotípics en l'organisme, inclús més greus que els que podríem trobar davant d'alteracions filogenètiques¹⁰⁰.

Genèticament, diversos estudis d'obesitat en individus amb cert parentesc demostren que al voltant del 40% dels casos d'obesitat resulten de l'herència de certs factors genètics. En els últims 20 anys, els factors ambientals han incrementat molt considerablement els ratis d'obesitat però els factors genètics juguen un paper clau en el desenvolupament d'aquesta patologia. Actualment, s'han identificat uns quants gens associats amb la obesitat tals com FTO, MC3R, MC4R, POMC, PCSK1 i NEGR1, tots ells tenen una forta implicació en la regulació de vies de senyalització implicades en l'homeòstasi de l'organisme i el control del pes corporal¹⁰¹.

No obstant, és l'epigenètica la que juga un paper important en l'increment tant pronunciat de la prevalença de l'obesitat, ja que mecanismes epigenètics com la metilació de l'ADN, l'empaquetament d'histones i la regulació per miRNAs, poden ser transmesos perfectament d'una generació a una altra tant mitòticament com meióticament. Els microRNAs (miRNAs) són cadenes no codificants d'entre 18 i 25 nucleòtids que regulen l'expressió i el silenciament gènics i s'ha demostrat que nivells alts d'alguns miRNAs es troben associats a valors d'IMC molt elevats¹⁰². D'altra banda, existeixen formes d'obesitat que estan estretament associades a una inhibició de la metilació del IGF2 (*insulin growth factor 2*) o d'altres gens com el HIF3A (*hypoxia-inducible factor 3a*), el IRS1 (*insulin receptor substrate 1*) o el GLUT4 (*glucose transport 4*)¹⁰³. Per tant, la consideració de les causes genètiques i epigenètiques de l'obesitat és una eina molt valuosa per al desenvolupament de noves estratègies i tractaments per fer front a aquesta patologia.

Terapèuticament, l'obesitat és una malaltia difícil d'abordar i, degut a la manca d'intervencions farmacològiques específiques, la millor opció per combatre aquesta patologia és la modificació de l'estil de vida. Una millora en els hàbits diaris acostuma a comportar un descens important del pes corporal i una conseqüent reducció dels riscos cardiovasculars¹⁰⁴. No obstant, existeixen tractaments farmacològics per fer front a aquesta patologia, però només es recomanen en aquells individus amb un IMC superior a 30. La FDA (*Food and Drug Administration*) ha aprovat diversos fàrmacs pel tractament de l'obesitat, tals com la *Naltrexone-Bupropion*, l'*Orlistat*, el *Liraglutide* o la *Phentermine-Topiramate*^{105,106}. A més, diverses investigacions han confirmat que existeixen 11 compostos vegetals provinents de les famílies *Celastraceae*, *Zingiberaceae*, *Theaceae*, *Magnoliaceae* i *Solanaceae* que presenten un gran potencial anti-obesitat ja que regulen el metabolisme de greixos, potencien els nivells hormonals i regulen la microflora intestinal, entre d'altres^{107,108}. Per als individus amb un IMC superior a 40, que són incapaços de perdre pes modificant el seu estil de vida i que tampoc han obtingut bons resultats emprant estratègies farmacològiques, la cirurgia bariàtrica és una opció factible, ja que es tracta d'un procés en el que no només hi ha una pèrdua pronunciada del pes corporal, sinó que també es redueix la inflamació crònica intestinal, s'afavoreix el microbioma intestinal i, en alguns casos, inclús és possible una remissió de la diabetis de tipus II^{109,110}. En darrer lloc, una nova estratègia terapèutica que està guanyant pes en l'actualitat és el trasplantament de microbiota fecal, on es produeix el traspàs dels microorganismes presents en la femta d'individus sans a pacients obesos per tal d'afavorir el seu metabolisme i produir així un descens del pes corporal¹⁰⁰.

Resumint, actualment es pot considerar l'obesitat com una pandèmia silenciosa ja que es preveu que en pocs anys s'haurà triplicat la prevalença d'aquesta patologia si ens fixem en els valors nets del 1975. A més, l'obesitat s'ha convertit en la malaltia associada a l'estil de vida que provoca més morts prematures i es pot considerar com a resultat de la combinació de factors ambientals com la nutrició o l'estil de vida amb la predisposició genètica del desenvolupament post natal⁸⁹.

1.4. La grelina

La grelina és un pèptid de 28 aminoàcids amb una funció principal orexigènica a nivell hormonal. Per tal de produir la seva acció, requereix d'una modificació post-traducciona que es basa en l'acilació de la serina que es troba en la posició 3 de la cadena aminoacídica¹¹¹. Aquesta acilació és produïda per un enzim anomenat GOAT, que es tracta d'una proteïna que es troba ancorada a la membrana del reticle endoplasmàtic mitjançant 11 dominis transmembrana i que s'expressa, sobretot, en les cèl·lules de l'estómac que s'encarreguen de la producció de grelina¹¹². No obstant, al voltant del 80% de la grelina que es detecta en plasma en l'ésser humà es troba en la seva forma no acilada o inactiva, ja que la forma acilada d'aquest pèptid presenta una vida mitjana molt curta, d'uns 8 minuts¹¹³. Aquesta grelina és sintetitzada majoritàriament per un tipus de cèl·lules endocrines que es troben a l'estómac, anomenades cèl·lules oxíntiques. Aquestes cèl·lules actuen com oscil·ladors que regulen la sensació de gana, fent que els nivells de grelina en plasma augmentin i disminueixin, fluctuant de forma circadiana mitjançant diversos sensors fisiològics, com la reducció de la mida de l'estómac o la detecció d'un dèficit calòric, a través dels quals el nostre organisme és capaç d'induir la síntesi de grelina¹¹⁴. Després de ser sintetitzat, aquest pèptid orexigènic s'allibera al torrent sanguini i viatja fins al SNC on és capaç de creuar la barrera hematoencefàlica i interaccionar amb els receptors de grelina ubicats sobretot en regions cerebrals com l'hipotàlem, l'hipocamp, l'àrea tegmental ventral, l'amígdala i les regions dopaminèrgiques del mesencèfal i l'estriat¹¹⁵. De fet, aquesta hormona augmenta la sensació de gana sobretot per la seva acció en els receptors localitzats en l'hipotàlem cerebral¹¹⁶.

D'altra banda, és important tenir en compte que, apart de la seva funció orexigènica a nivell central, la grelina té moltes altres funcions en teixits perifèrics. A nivell estomacal, afavoreix la mobilitat gàstrica i la secreció d'àcid gàstric, a nivell pulmonar, promou la vasodilatació i disminueix els processos inflamatoris, a nivell cardíac, redueix la pressió sanguínia i augmenta el desgast cardíac, a nivell hepàtic, afavoreix la lipogènesi, a nivell pancreàtic, disminueix la secreció d'insulina i regula el metabolisme de la glucosa, mentre que a nivell de teixit adipós blanc, disminueix la oxidació lipídica¹¹⁷. Així, la funció principal de la grelina és produir la sensació de gana a nivell del SNC, però presenta moltes altres funcions perifèriques que representen un paper clau d'aquesta hormona orexigènica en la regulació de l'homeòstasi en l'organisme humà (Figura 7).

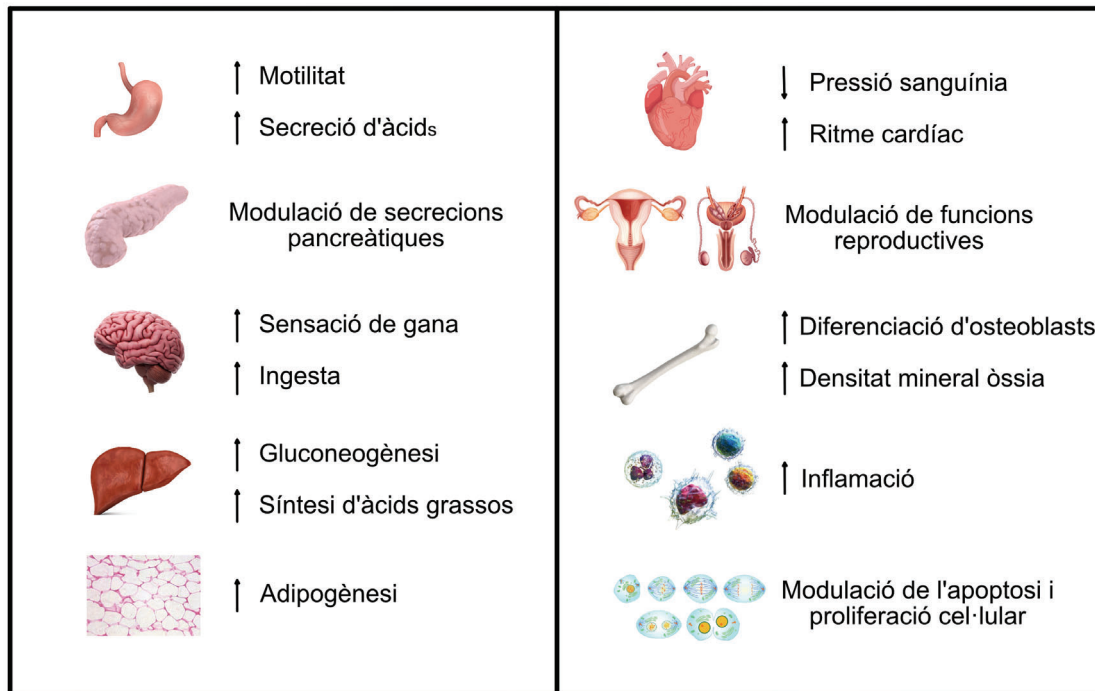


Figura 7: Funcions centrals i perifèriques de la grelina.

1.4.1. El receptor de grelina (GHS-R)

La grelina realitza la seva funció mitjançant la unió al receptor de grelina, un GPCR de la família A que rep el nom de *growth hormone secretagogue receptor* (GHS-R). Concretament, existeixen dues variants del receptor de grelina, el receptor de grelina 1a (GHS-R1a) i el receptor de grelina 1b (GHS-R1b), que es tracta d'una variant truncada del receptor GHS-R1a que manca dels dominis transmembrana 6 i 7. La falta d'aquests dos dominis transmembrana impedeix que la grelina pugui interaccionar amb aquesta variant i, a més, al no tenir el domini transmembrana 6, aquesta variant tampoc és capaç d'acoblar proteïna G ni senyalitzar¹¹⁸. La variant GHS-R1a del receptor de grelina consta de 366 residus en la seva cadena aminoacídica, mentre que la variant 1b està formada per 289 aminoàcids¹¹². Al ser activat per la grelina, el receptor GHS-R1a serà capaç d'acoblar proteïna G_q, que activarà la fosfolipasa C, alliberant inositol-3-fosfat (IP₃) i diacilglicerol (DAG) i desembocant en un augment en l'alliberació de calci des del reticle endoplasmàtic a l'espai intracel·lular. A més, hi ha GPCR que s'anomenen receptors promiscus, ja que poden acoblar més d'una proteïna G. Un cas clar és el receptor de grelina; aquest, s'acobla a proteïna G_q principalment, però també a proteïna G_i, produint una inhibició de l'enzim adenilat ciclase que desembocarà en una disminució dels nivells d'AMP cíclic intracel·lulars. D'altra banda, aquesta variant 1a també és capaç d'activar la via de fosforilació de les MAPK mitjançant les subunitats β/γ de la proteïna G a la qual s'acobla (Figura 8)¹¹⁹.

Durant molts anys, es creia que la variant truncada del receptor de grelina, GHS-R1b, era simplement un vestigi evolutiu i no presentava cap funció. Però després de diversos estudis i publicacions, es va determinar quin és el paper fisiològic de la variant GHS-R1b.

Primerament, es va demostrar que les cèl·lules que expressen la variant GHS-R1b també expressen conjuntament la variant GHS-R1a. També es va observar que aquestes dues variants són capaces d'homo i heterodimeritzar entre si, fet que permet que la variant GHS-R1b tingui una funció reguladora sobre la variant GHS-R1a. Concretament, els estudis demostren que GHS-R1b exerceix una regulació negativa sobre GHS-R1a i s'han proposat dos mecanismes pels quals es produeix aquesta modulació. Per un costat, quan les variants GHS-R1a i GHS-R1b es troben interaccionant, la variant 1b pot produir la retenció intracel·lular de la variant 1a i impedir que arribi a la membrana plasmàtica, on seria capaç de produir la transducció del senyal¹²⁰. D'altra banda, el segon mecanisme consisteix en que les dues variants es troben interaccionant formant un complex que produeix un canvi conformacional sobre el receptor GHS-R1a que impedeix que senyalitzi¹¹⁸. De fet, aquests dos mecanismes no tenen perquè ser excloents. No obstant, cal destacar que estudis més recents han demostrat que el receptor GHS-R1b presenta un comportament dual, que varia en funció dels nivells d'expressió d'aquesta variant. Gemma Navarro i col·laboradors varen demostrar al 2016 que davant d'una baixa expressió del receptor GHS-R1b, aquest produirà una regulació positiva sobre el receptor GHS-R1a ja que afavoreix el seu transport cap a la membrana plasmàtica, mentre que davant d'uns nivells alts d'expressió del receptor GHS-R1b, aquest modularà negativament al receptor GHS-R1a produint canvis conformationals en ell que inhibiran el seu transport a membrana i la seva transducció del senyal¹²¹.

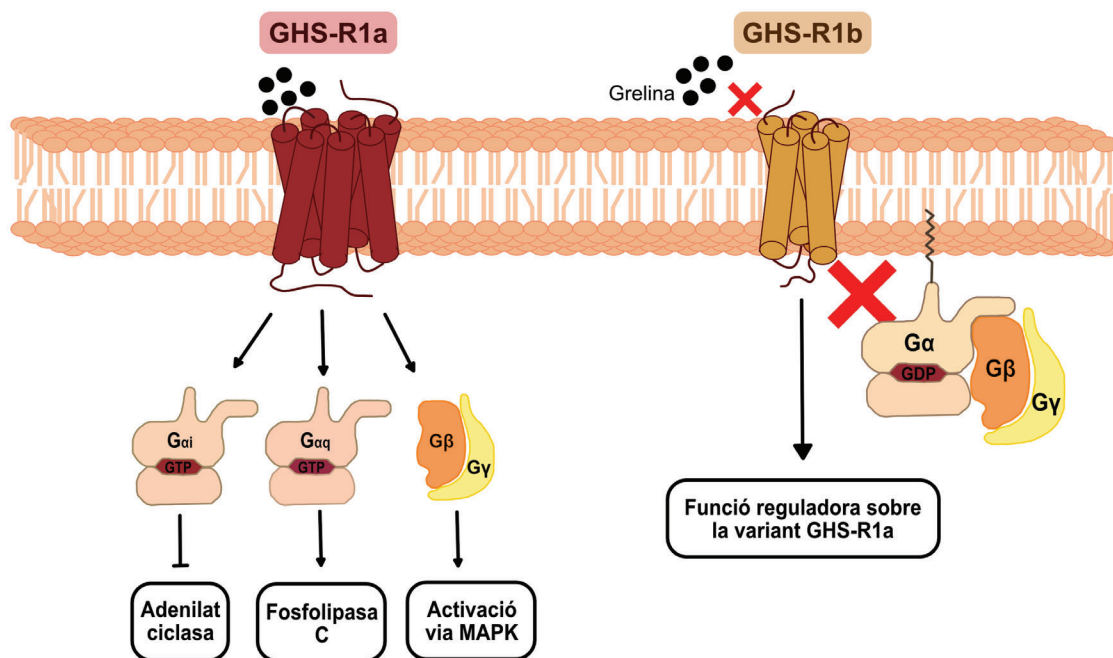


Figura 8: Representació gràfica de les dues variants del receptor de grelina.

La zona del cervell on trobem una major expressió dels receptors GHS-R1a i GHS-R1b és l'àrea tegmental ventral (TVA), que es troba altament implicada en mecanismes i comportaments relacionats amb el circuit de la recompensa¹²². És per aquest motiu que diversos estudis proposen el pèptid de la grelina com un agent capaç de participar en el circuit de la recompensa, regulant la sensació de gana mitjançant l'anticipació de la sensació que produeix la ingesta d'aliments i generant així una expectativa i un reforç positiu.

De fet, s'han fet estudis de comportament amb ratolins que demostren que aquests animals sempre passen més temps en les zones associades a una recompensa alimentària i aquest temps es veu reduït en presència de tractaments amb els antagonistes del receptor GHS-R1a i en ratolins *knockout* per aquest mateix receptor¹²³.

1.4.2. L'heteromerització del receptor de grelina

El receptor de grelina GHS-R1a és un receptor acoblat a proteïna G que pot interaccionar amb altres GPCR per tal de formar noves unitats funcionals que presentin característiques completament diferents a les dels receptors individuals. La formació d'aquests complexos obre un ventall immens de noves dianes terapèutiques amb les que es podrien sintetitzar fàrmacs per a combatre patologies com els trastorns alimentaris o addiccions. En la bibliografia trobem diversos heteròmers àmpliament descrits on participa el receptor de la grelina¹²⁴.

Com a primer exemple, focalitzarem la nostra atenció en la interacció formada pel receptor dopaminèrgic D₁ i el receptor de grelina GHS-R1a, que es troben expressats conjuntament en l'hipocamp. Curiosament, el pèptid de la grelina no és detectable a l'hipocamp, en aquest sentit, la presència de receptors de grelina en aquesta àrea cerebral hauria de tenir una funció molt específica. Després de nombrosos estudis, es va detectar que aquests dos receptors són capaços d'interaccionar formant unitats dimèriques en les que el receptor de grelina provoca un canvi d'acoblament a proteïna G del receptor dopaminèrgic, que deixa d'acoblar una proteïna G_q i passa a senyalitzar a través d'una proteïna G_s. A més, es va observar que, en presència d'antagonistes del receptor de grelina, aquest canvi d'acoblament de proteïna G no es produïa. Per tant, podem afirmar que una de les funcions del receptor de grelina en l'hipocamp és la modulació de l'acció del receptor dopaminèrgic D₁ quan ambdós receptors es troben interaccionant i formant complexos dimèrics¹²⁵. Paral·lelament, al 2018 es va determinar que el receptor de grelina també és capaç d'interaccionar amb el receptor dopaminèrgic D₂ en neurones hipotalàmiques. En aquest cas, es tracta d'una formació estructural tetramèrica formada per dos homodímers de GHS-R1a i dos homodímers D₂R en el que el receptor de grelina actua modulant positivament la senyalització G_i del receptor D₂¹²⁶.

El receptor de grelina també és capaç d'interaccionar formant complexos amb altres receptors. Un nou exemple seria la formació de l'heteròmer GHS-R1a-OTR en el que el receptor de grelina GHS-R1a interacciona amb el receptor d'oxitocina OTR. Aquest complex, a nivell funcional, es caracteritza per un clar *cross-talk* negatiu, on l'activació del receptor de grelina produeix un descens significatiu en la senyalització del receptor OTR a través de la proteïna G_q. La formació d'aquest complex podria explicar la implicació del receptor de grelina en desordres de l'estat d'ànim com la depressió o la ansietat¹²⁷.

Per últim, un altre exemple interessant a tenir en compte és la formació de l'heteròmer GHS-R1a-STT5 entre el receptor de grelina i el receptor de somastatina de tipus 5 (STT5) en cèl·lules β pancreàtiques. La formació d'aquest dímer depèn directament dels nivells d'expressió d'ambdós receptors. Quan l'expressió és elevada, s'afavoreix la formació de l'heteròmer i el receptor STT5 modula la funció del receptor GHS-R1a, que s'acoblarà principalment a la proteïna G_i . D'altra banda, davant d'uns nivells baixos d'expressió d'ambdós receptors, s'inhibeix la formació de l'heteròmer i el receptor de grelina manté la seva prioritat d'acoblament a la proteïna G_q ¹²⁸.

1.4.3. El rol de la grelina en l'obesitat

L'etiologia de l'obesitat és realment complexa, però sabem que és un conjunt de factors genètics i ambientals els que es troben implicats en el desenvolupament d'aquesta patologia. La grelina és una hormona orexigènica que es troba estretament relacionada amb aquesta patologia. S'estipula que existeixen dos possibles accions principals a través de les quals la grelina podria produir un fenotip d'obesitat: la sobreproducció de grelina per part de l'organisme o un augment en la sensibilitat del receptor d'aquest pèptid orexigènic. Certament, el fet de determinar la correlació exacta entre la grelina i l'obesitat és un factor vital per tal de poder fer front a aquesta patologia alimentària¹²⁹.

El rol exacte de la grelina en l'obesitat encara es troba sota una investigació exhaustiva. Tot i això, la conclusió que comparteixen diversos estudis és que la inhibició de la producció de grelina és molt més baixa en individus obesos que en individus amb un índex de massa corporal estàndard i això faria que els organismes obesos siguin capaços de consumir una quantitat molt més elevada d'aliments. Per tant, en individus obesos trobem una sobreproducció d'aquesta hormona orexigènica. No obstant, la majoria d'estudis demostren que el problema no es centra tant en la sobreproducció de grelina, sinó que és degut a la híper-sensibilitat a aquesta hormona orexigènica. És a dir, en individus obesos, apareixen un seguit de disfuncions que provoquen que no es suprimeixin els efectes de la grelina correctament i, per tant, aquesta hormona pot allargar la seva funcionalitat^{130,131}. Contràriament, existeixen diversos estudis que ens mostren que els pacients amb anorèxia nerviosa presenten un augment paradoxal en els seus nivells de grelina en sang respecte als nivells en individus normals i obesos, fet que ens suggereix que en el cas de l'anorèxia nerviosa ens trobem davant d'una insensibilització a aquesta hormona mentre que en el cas de l'obesitat ens trobaríem davant d'una híper-sensibilització^{132,133}.

Cal tenir en compte que existeixen moltes limitacions a l'hora de mesurar els nivells de grelina en sang, ja que, existeixen dues formes circulants d'aquesta hormona orexigènica, la forma activa (10%) i l'inactiva (90%), essent la forma activa altament inestable a temperatura ambient, i conseqüentment, molt difícil de mesurar. Sigui com sigui, la conclusió principal és que els trastorns alimentaris com l'obesitat o l'anorèxia no són causats per un augment o disminució de la producció de grelina sinó que són causats per un augment o disminució en la sensibilitat de l'organisme per aquesta hormona^{131,134}.

1.5. El Sistema Cannabinoide

Des de fa molts i molts anys, els extractes de la planta *Cannabis sativa* s'han fet servir com a compostos per combatre diverses patologies degut a les seves propietats analgèsiques, antioxidants i antiinflamatòries. No va ser fins a principis del segle XIX, quan es va aïllar per primera vegada un compost de la planta del cànnabis, el cannabícol (CBN). Seguidament, va ser aïllat el compost més abundant de la planta, el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) que és el principal responsable dels efectes psicoactius que indueix el consum de cànnabis¹³⁵. Fins a dia d'avui, s'ha aconseguit aïllar més de 130 cannabinoides diferents extrets de la planta *Cannabis sativa* que poden ser classificats químicament com terpenofenols¹³⁶. El Δ^9 -THC presenta caràcter addictiu degut al seus efectes psicoactius i moduladors de la funció dopaminèrgica a nivell del SNC, incrementant l'alliberació de dopamina en diferents àrees cerebrals, de la mateixa manera que altres substàncies d'abús com la cocaïna o les amfetamines. S'estima que al voltant del 9% de les persones que han estat en contacte amb el cànnabis desenvolupen conductes d'addicció a aquesta substància tals com l'ansietat, la dificultat per dormir, la pèrdua de pes corporal o, inclús, els tremolors¹³⁷. Segons l'Informe Europeu de Drogues, Espanya és el tercer país on es consumeix més cànnabis de tota Europa i aquesta dada no deixa d'incrementar, essent la incidència de consum esporàdic en persones d'entre 15 i 64 anys d'un 14,5% al 1995 i augmentant fins al 37,9% en l'actualitat.

El Sistema Endocannabinoide, present en el nostre organisme, està constituït pel conjunt format pels compostos endocannabinoides, els enzims responsables de la seva síntesi i degradació, els receptors cannabinoides i els transportadors. A més, aquest sistema presenta un tipus de senyalització molt característica, la senyalització retrògrada, que es basa en que els compostos cannabinoides són sintetitzats en la neurona postsinàptica per tal d'unir-se als receptors que es troben en la neurona presinàptica. Per tant, els lligands endocannabinoides, com l'anandamida i el 2-araquidonilglicerol, són sintetitzats en la neurona postsinàptica, pels enzims NAPE-PLD i DAGL α respectivament, i són alliberats cap al terminal presinàptic on interaccionaran específicament amb els receptors cannabinoides i, finalment, seran degradats pels enzims FAAH i MAGL respectivament (Figura 9). No obstant, s'ha vist que els receptors cannabinoides també es poden expressar en la membrana postsinàptica¹³⁸. A part d'aquesta senyalització retrògrada, una altra característica important del Sistema Endocannabinoide és que presenta una gran plasticitat, és a dir, una alta capacitat homeostàtica i autoreguladora. Per exemple, els receptors cannabinoides presents en la membrana plasmàtica s'internalitzen davant d'exposicions perllongades a lligands cannabinoides o davant de certs estímuls com l'exposició a situacions d'estrès o la ingesta d'aliments¹³⁹.

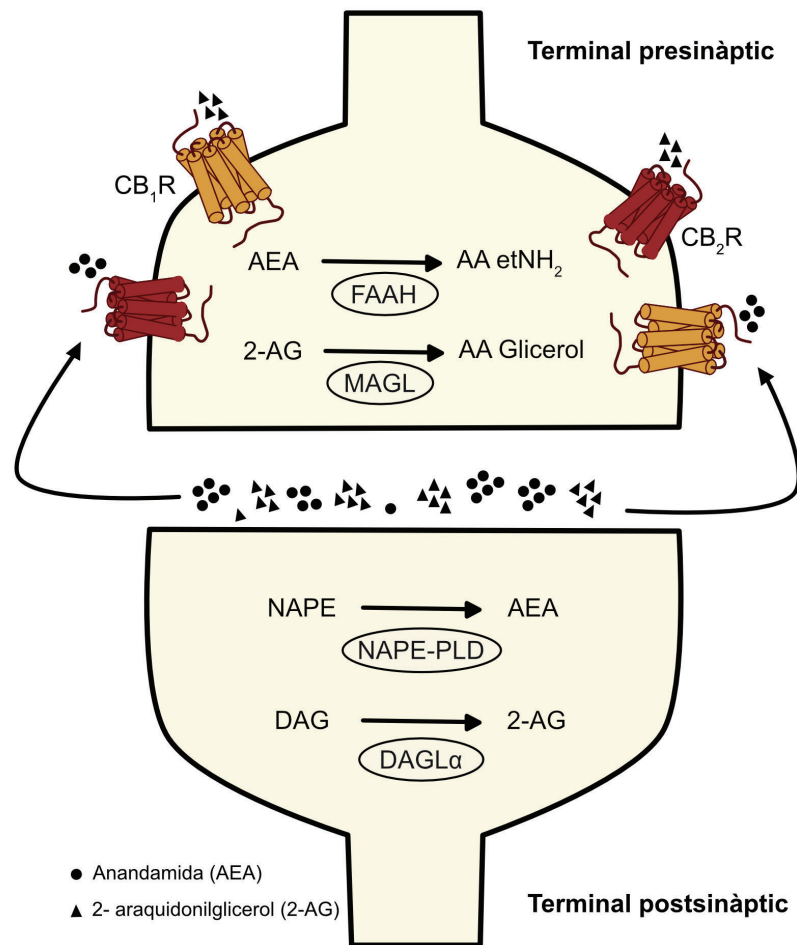


Figura 9: Senyalització retrògrada del Sistema Endocannabinoide.

Al 1990, es va clonar per primera vegada el receptor cannabinoide de tipus 1 (CB₁R)¹⁴⁰ i, tres anys més tard, es va clonar el receptor cannabinoide de tipus 2 (CB₂R)¹⁴¹. Tant el CB₁R com el CB₂R, formen part de la superfamília de receptors acoblats a proteïna G o GPCR i ambdós receptors es troben altament conservats entre espècies, mostrant una homologia superior al 80% entre les seqüències d'humà i ratolí¹⁴². No obstant, els dos receptors cannabinoïdes presenten poca homologia entre si, únicament al voltant d'un 40%, si comparem les seves seqüències¹⁴³.

Actualment, els compostos cannabinoïdes es poden dividir en tres grups en funció del seu origen:

- Endocannabinoïdes: són els compostos cannabinoïdes que es sintetitzen de manera fisiològica en el nostre organisme. Els dos endocannabinoïdes amb més rellevància fisiològica són l'anandamida (AEA) i el 2-araquidonilglicerol (2-AG), essent aquest últim el compost endocannabinoide més abundant dins del nostre organisme ja que presenta una concentració 200 vegades superior a l'anandamida. No obstant, és important destacar que en el nostre organisme trobem altres endocannabinoïdes com la N-araquidonil-dopamina, l'èter de 2-AG i l'araquidonil-etanolamina o virodamina, però es troben en concentracions molt més reduïdes i presenten poca rellevància fisiològica.

Sigui com sigui, la presència d'endocannabinoides en el nostre organisme és imprescindible per tal de mantenir l'homeòstasi i l'equilibri intern¹⁴⁴.

- Fitocannabinoides: són els compostos cannabinoides que s'extreuen de la planta *Cannabis sativa*. Entre tots ells, el compost psicoactiu majoritari és el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC), que representa aproximadament el 17% del contingut total de compostos cannabinoides de la planta del cànnabis. D'altra banda, el compost més abundant i considerat com a no-psicoactiu és el cannabidiol (CBD), seguit d'altres fitocannabinoides rellevants com el cannabigerol (CBG) i el cannabinol (CBN). Cal destacar que els fitocannabinoides es troben en la planta *C. sativa* de manera natural en les seves formes àcides (Δ^9 -THCA, CDBA, CBGA) a partir de les quals podem aïllar la seva forma neutra (Δ^9 -THC, CBD, CBG) i varínica (Δ^9 -THCV, CBDV, CBGV)¹⁴⁵.

- Cannabinoides sintètics: és un grup molt heterogeni de diferents cannabinoides que són sintetitzats artificialment en els laboratoris per tal d'obtenir compostos capaços d'interaccionar amb els receptors cannabinoides¹⁴⁶. És important destacar el compost ACEA com a agonista específic del receptor CB₁ i el compost JWH-133 com a agonista específic del receptor CB₂ ja que són els dos lligands sintètics que s'han fet servir durant el desenvolupament dels resultats d'aquesta Tesi Doctoral.

El Sistema Endocannabinoide es troba implicat en la regulació d'un ampli ventall de processos fisiològics tals com el control de la sensació de gana, el desenvolupament neuronal, la regulació del sistema immunitari, la neuroprotecció i el control de la nocicepció¹⁴⁷. És per això, que el Sistema Cannabinoide es planteja com un objectiu clar d'investigació per tal de fer front a diverses patologies i desenvolupar nous fàrmacs que es poden aplicar en diferents teràpies. Durant mil·lennis, els compostos cannabinoides s'han fet servir per a pal·liar el dolor, de fet, el seu ús es remunta a l'antiga xina¹⁴⁸ i actualment se sap que són compostos clau per a tractaments antiinflamatoris i antinociceptius. El receptor CB₁ es troba implicat en diversos processos relacionats amb la nocicepció, mentre que el receptor CB₂ presenta un gran paper analgèsic i antiinflamatori en models de dolor agut i crònic^{149,150}. D'altra banda, degut a l'expressió del receptor CB₁ en teixit adipós i fetge i a l'alta expressió de compostos endocannabinoides en persones amb obesitat, els compostos cannabinoides també es fan servir com a tractament en trastorns metabòlics. Un exemple és l'antagonista selectiu del receptor CB₁, el Rimonabant, que va ser aprovat com a tractament per reduir l'obesitat¹⁵¹. A més, està descrit que l'activació del receptor CB₁ s'associa amb la inhibició de les nàusees, per això, hi ha agonistes del receptor CB₁ que són utilitzats com a tractament anti-emètic¹⁵².

En la literatura, també es parla dels compostos cannabinoides com a possible tractament anti-cancerigen, ja que està descrit que els receptors cannabinoides es troben sobreexpressats en diversos tipus de càncer, on també apareixen nivells d'endocannabinoides superiors als fisiològics. A més, se sap que els compostos cannabinoides es troben implicats en la regulació de la proliferació cel·lular. En aquest sentit, s'estan desenvolupant noves teràpies amb compostos cannabinoides que inhibeixen la proliferació de cèl·lules canceroses i disminueixen la seva capacitat metastàtica¹⁵³. Per últim, també trobem diversos estudis que utilitzen els compostos

cannabinoides per la seva activitat neuroprotectora, ja que està demostrat que el Δ^9 -THC o el CBD presenten propietats neuroprotectores actuant principalment a través del receptor CB_2 ¹⁵⁴.

Actualment, es comercialitzen diversos fàrmacs que contenen compostos cannabinoides. Un exemple seria el Sativex®, que és una barreja de diversos fitocannabinoides amb una proporció al 50% de dos principis actius principals, el CBD i el Δ^9 -THC, i s'utilitza per combatre la simptomatologia de l'Esclerosi Múltiple¹⁵⁵. A més, també trobem altres exemples com el Dronabinol® i el Cesamet®, que són compostos aprovats per combatre les nàusees durant la quimioteràpia i el seu principi actiu és el Δ^9 -THC¹⁵².

1.5.1. El receptor de cannabinoides de tipus 1 (CB_1R)

El receptor de cannabinoides de tipus 1 és el GPCR més abundant a nivell de SNC i, actualment, un dels millors caracteritzats. Es tracta d'un receptor acoblat a proteïna G de classe A que està format per 473 aminoàcids. Concretament, el seu extrem N-terminal és inusualment llarg (117 aminoàcids) mentre que l'extrem C-terminal té una longitud similar als demés GPCR (73 aminoàcids). Conté tres cisteïnes i dominis rics en serina i treonina susceptibles a ser fosforilats, que tenen un paper rellevant en la senyalització d'aquest receptor. L'estructura d'aquest receptor CB_1 , amb el seu lligand específic AM6538 unit, ha estat descrita amb detall mitjançant cristal·lització d'alta resolució¹⁵⁶.

La unió de lligand al receptor desemboca en un canvi estructural que obre l'hèlix transmembrana 6, permetent, així, la interacció amb la proteïna G_i . Per tant, l'activació del receptor CB_1 desencadenarà en la inhibició de l'enzim adenilat ciclasa i produirà una disminució dels nivells d'AMP cíclic intracel·lulars. No obstant, també s'ha descrit l'acoblament del receptor CB_1 a proteïnes de tipus G_q en condicions o entorns excepcionals com els cultius primaris d'astròcits¹⁵⁷. De manera independent a la proteïna G, l'activació del receptor CB_1 també pot desembocar en l'activació de la fosforilació de les proteïnes MAPK, el reclutament de β -arrestines i la fosforilació de p38 o c-Jun¹⁵⁸. Fisiològicament, l'activació del receptor CB_1 es troba involucrada en la regulació de la nocicepció, el metabolisme, l'aprenentatge, la percepció sensorial i la memòria. També està descrita una forta implicació del receptor CB_1 en la digestió, la depressió, el dolor crònic i la por. A més, és el principal responsable dels efectes psicoactius produïts pel consum de cànnabis¹⁵⁹.

L'expressió del receptor cannabinoide de tipus 1 és promiscua en l'organisme humà, ja que trobem alts nivells d'expressió en el fetge, els ossos, els pulmons, el cor, l'endotel vascular, el sistema nerviós i perifèric i el sistema reproductor. A més, el receptor CB_1 també es troba expressat en el globus ocular, la pròstata, la medulla òssia, les amígdales i el timus (Figura 10)¹⁴³.

Terapèuticament, l'ús d'antagonistes i agonistes inversos que actuen en el centre ortostèric del receptor CB₁ s'està investigant àmpliament com a teràpies efectives de diverses patologies. Un clar exemple seria el Rimonabant, que és l'antagonista específic del receptor CB₁, i va ser aprovat per la FDA al 2006 com a teràpia efectiva per a la reducció de la gana davant d'estadis d'obesitat¹⁶⁰. No obstant, dos anys més tard fou retirat del mercat degut a que els seus efectes secundaris no superaven els beneficis terapèutics. En contraposició, els agonistes del receptor CB₁ no s'estudien com a teràpies efectives ja que una activació del receptor CB₁ pot presentar cert caràcter psicotròpic que desembocaria en conductes depressives i d'ansietat¹⁶¹. Sí que s'estan utilitzant moduladors positius del receptor CB₁ que s'uneixen al centre al·lostèric com és el cas del cannabidiol o CBD. Aquesta estratègia terapèutica està despertant un gran interès en la comunitat científica i s'han desenvolupat diversos compostos. Entre ells, el GAT-211, l'ORG27569, la lipoxina, l'A4 i el RTI-371. Aquests compostos actuen modulant l'activitat del receptor CB₁ ja que són capaços d'augmentar o reduir l'afinitat del receptor pels lligands específics que s'uneixen al seu centre ortostèric o també són capaços de produir canvis conformationals en la seva estructura que disminueixen o potencien la seva funcionalitat¹⁶². D'altra banda, també s'està tenint en compte la selectivitat funcional dels agonistes del receptor CB₁, ja que la majoria de compostos cannabinoides es comporten com agonistes esbiaixats. Entre els endocannabinoides, el 2-AG i l'AEA senyalitzen preferentment a través de G_i, mentre que la N-araquidonil dopamina (NADA) ho fa a través de G_q. La selectivitat funcional d'un compost cannabinoide dependrà de factors com el tipus cel·lular o la possible oligomerització del receptor CB₁ amb altres GPCR. D'aquesta manera, es pot fer ús d'agonistes del receptor CB₁ que activin preferentment la via de senyalització que provoca l'efecte desitjat i així impedir que s'activi la transducció de senyal que provoca els efectes secundaris¹⁵⁸.

En darrer lloc, és important destacar que el receptor CB₁ és un dels transductors de senyals més importants en l'organisme humà. La seva expressió es troba generalitzada per tot l'organisme i engloba un gran conjunt de funcions fisiològiques, però la seva importància s'accentua sobretot a nivell de Sistema Nerviós Central, ja que és el GPCR que presenta una major expressió en aquesta zona. És per aquest motiu que la seva activació o bloqueig específics poden oferir un gran ventall de possibilitats terapèutiques, sempre i quan s'evitin els possibles efectes indesitjats.

1.5.2. El receptor de cannabinoides de tipus 2 (CB₂R)

El receptor de cannabinoides de tipus 2 és un GPCR de classe A. Mitjançant la tècnica de ressonància magnètica nuclear (RMN), s'ha determinat amb precisió la seva estructura, que consta d'un total de 360 aminoàcids. En l'ésser humà, el receptor CB₂ presenta un polimorfisme d'una única base (SNP) en la posició 63; una arginina substitueix a una glutamina (Q63R). Aquesta mutació puntual té com a conseqüència canvis fisiològics rellevants que poden produir pèrdues en el control de la resposta immunitària, una major predisposició a l'obesitat o una major incidència a l'alcoholisme¹⁶³.

L'expressió del receptor CB₂ és més limitada que la del receptor CB₁, ja que s'expressa bàsicament en cèl·lules del sistema immunitari, Sistema Nerviós Central (SNC) i sistema hematopoètic, sobretot en la melsa i el timus (Figura 10). És important tenir en compte que, a nivell del SNC, el receptor CB₂ presenta una expressió relativament baixa en condicions fisiològiques i que aquesta augmenta molt considerablement davant d'estadis de neuroinflamació¹⁴³.

Funcionalment, quan un agonista específic s'uneix al receptor CB₂, aquest és capaç d'acoblar majoritàriament la proteïna G_i, provocant una inhibició de l'enzim adenilat ciclasa i produint un descens en els nivells d'AMP cíclic intracel·lulars. A nivell de la via independent de la proteïna G, aquest receptor també és capaç de promoure vies de senyalització com la fosforilació de MAPK o el reclutament de β-arrestines I i II. Al contrari que en el cas de CB₁R, no està descrit que el receptor CB₂ sigui capaç d'acoblar proteïna G_q¹⁶⁴. Fisiològicament, sabem que el receptor CB₂ es troba implicat en processos com la regulació de la resposta immunitària, el dolor, la inflamació i la modulació de diversos processos metabòlics. S'ha descrit que en les cèl·lules microgials que envolten el dany cerebral, apareix un augment considerable de l'expressió d'aquest receptor, que promourà l'alliberació de factors antiinflamatoris i inhibirà la producció de factors proinflamatoris, desembocant en una cascada de senyalització que afavorirà la neuroprotecció i la supervivència neuronal¹⁶⁵. Així, el rol neuroprotector del receptor CB₂ l'ha convertit en una potencial diana terapèutica per una gran varietat de malalties que cursen amb neuroinflamació, on el control de la resposta immunitària és especialment interessant. Contràriament al receptor CB₁, s'han desenvolupat teràpies amb agonistes específics del receptor CB₂ ja que aquest receptor no indueix un efecte psicoactiu. Actualment, existeixen diversos assajos clínics en marxa amb compostos sintètics que actuen com agonistes específics de CB₂ i presenten potencial terapèutic per tal de fer front a patologies com la dermatitis al·lèrgica, l'encefalomielitis, la isquèmia cerebral, l'arteriosclerosi o la colitis ulcerosa¹⁶⁶. No obstant, desenvolupar compostos cannabinoides específics únicament pel receptor CB₂ no és trivial, ja que aquest receptor presenta un centre d'unió al lligand gairebé idèntic al receptor CB₁^{167,168}.

Actualment, hi ha diverses línies d'investigació amb l'objectiu de potenciar les aplicacions terapèutiques del receptor CB₂. Un exemple recau en la malaltia d'Alzheimer, on s'ha demostrat la capacitat de l'agonista específic del receptor CB₂, JWH-133, de modular la reactivitat de la micròglia reduint els nivells de la citocina proinflamatòria IL-6¹⁶⁹. D'altra banda, en l'Esclerosi Múltiple, s'han obtingut resultats positius fent ús del fitocannabinoide β-cariofilè, que actua com agonista del receptor CB₂ i evita l'agreujament de la malaltia en ratolins amb encefalomyelitis autoimmunològica experimental (EAE)¹⁷⁰. A més, també hi ha estudis que demostren que el β-cariofilè també presenta efectes prometedors en la malaltia de Parkinson, ja que és capaç d'atenuar molt considerablement els nivells de neuroinflamació¹⁷¹. Per últim, destacar que el compost O-1966, un agonista específic del CB₂R, produeix una millora en la patologia d'isquèmia cerebral, ja que redueix les àrees de teixit infartat¹⁷².

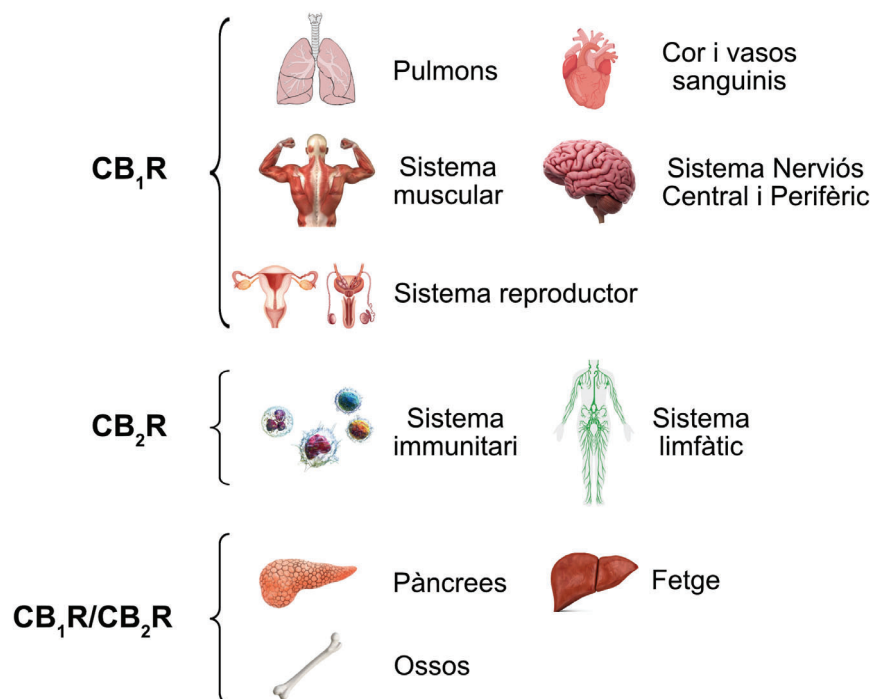


Figura 10: Expressió i distribució dels receptors cannabinoïdes CB₁ i CB₂ en l'organisme humà.

1.5.3. L'heteromerització dels receptors CB₁ i CB₂

Recentment, s'ha descrit amb detall la capacitat dels receptors cannabinoïdes per interaccionar entre ells formant l'heteròmer CB₁R-CB₂R. Aquest complex, com qualsevol oligòmer de GPCR, es comporta com una nova unitat funcional que es caracteritza pels fenòmens de *cross-talk* negatiu, ja que l'activació d'un dels dos receptors de l'heteròmer bloqueja el senyal del receptor veí, i de *cross-antagonisme*, on el bloqueig de la senyalització d'un dels dos receptors de l'heteròmer mitjançant el seu antagonista selectiu, produeix la inhibició del receptor veí, i viceversa. Per tant, podem concloure que els receptors cannabinoïdes són capaços de bloquejar-se entre si en condicions fisiològiques¹⁷³.

A més, els receptors cannabinoïdes també són capaços d'interaccionar amb altres tipus de GPCR formant nous heteròmers. De fet, en la literatura trobem diversos heteròmers constituïts per receptors cannabinoïdes com, per exemple, el complex format pel receptor CB₁ i el receptor d'adenosina A_{2A}, que s'encarrega de modular l'alliberació de glutamat en l'estriat i forma complexos tetramèrics constituïts per dos protòmers de CB₁R i dos protòmers d'A_{2A}R¹⁷⁴. Un altre exemple seria la capacitat del receptor CB₁ per interaccionar amb els receptors opioïdes MOR i KOR, on s'ha descrit que els receptors cannabinoïdes i opioïdes es bloquegen entre si, actuant com a grans dianes terapèutiques per a teràpies analgèsiques contra el dolor¹⁷⁵.

D'altra banda, aquest mateix any s'ha demostrat una interacció directa entre els sistemes endocannabinoide i de renina-angiotensina de l'organisme humà, ja que el receptor CB₁ i el receptor AT₁ interaccionen formant un complex en el que el receptor CB₁ bloqueja el senyal del receptor AT₁ i aquest senyal es veu àmpliament potenciat en presència d'antagonistes del receptor CB₁ com el Rimonabant¹⁷⁶. Aquest bloqueig d'un receptor sobre un altre que s'observa en presència de l'antagonista selectiu, és una característica molt comuna que pot aparèixer en molts heteròmers de GPCR.

Si ens centrem en el receptor CB₂, aquest també és capaç de formar heteròmers amb diversos GPCR. Al 2019, es va detectar que el receptor CB₂ és capaç d'interaccionar amb el receptor HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*), que es troba fortament implicat en el càncer de mama ja que una sobreexpressió d'aquest receptor desemboca en proliferacions cel·lulars neoplàsiques. Es va observar que l'activació del receptor CB₂ mitjançant el Δ⁹-THC, afavoria la disrupció de l'heteròmer i la posterior degradació del receptor HER2, inhibint així, la progressió de la malaltia neoplàsica¹⁷⁷. Durant aquest mateix any, també es va identificar l'heteròmer format pel CB₂R i el receptor d'adenosina A_{2A} en cèl·lules microgials on els antagonistes del receptor A_{2A}, potenciaven els efectes neuroprotectors i antiinflamatoris del receptor CB₂ en ser activat amb el seu agonista selectiu¹⁷⁸. Un altre exemple rellevant podria ser l'heteròmer format pel receptor CB₂ i el receptor ionotròpic de glutamat NMDA, que presenta una empremta característica ja que el CB₂R bloqueja totalment l'efecte del receptor NMDA en cultius primaris de micròglia activada amb LPS i interferó-γ. A més, aquest heteròmer es troba sobreexpressat en ratolins APP_{Sw/Ind}, model animal de la malaltia d'Alzheimer¹⁷⁹.

Cal destacar que la gran capacitat que presenten els receptors cannabinoïdes per formar heteròmers amb altres GPCR expandeix els límits de la senyalització i els efectes cannabinoïdes.

1.5.4. El rol dels cannabinoïdes en l'obesitat

El teixit adipós està format per tres tipus cel·lulars principals: els adipòcits blancs que s'encarreguen de l'acumulació de greix i la secreció hormonal, els adipòcits marrons que s'encarreguen de la termogènesi i del desgast calòric i, per últim, els adipòcits beix que són cèl·lules traslacionals que, en funció dels estímuls rebuts, es diferenciarien en adipòcits blancs o marrons. El *browning* és el procés a través del qual els adipòcits blancs o beix passen a ser adipòcits marrons. Un procés que s'està estudiant en l'actualitat i que es considera clau per tal de combatre l'obesitat. En aquest procés trobem una implicació important del sistema cannabinoide endogen, ja que els receptors cannabinoïdes també participen en la regulació de la termogènesi, la ingesta i la inflamació. Més concretament, la inhibició del receptor CB₁ afavoreix la reducció de la ingesta i del pes corporal, mentre que l'estimulació del receptor CB₂ redueix la inflamació i promou diversos mecanismes anti-obesitat com el *browning*¹⁸⁰.

El Sistema Endocannabinoide es troba molt implicat en el control de l'energia metabòlica, en particular, el receptor CB₁ està involucrat en la regulació del metabolisme lipídic i de la glucosa. El receptor CB₁ es troba expressat, majoritàriament, a nivell del Sistema Nerviós Central (SNC), però davant d'estadis d'obesitat, la seva expressió en teixits perifèrics es veu incrementada. La deleció genètica del receptor CB₁ resulta en una reducció del pes corporal dels ratolins *knockout* per aquest receptor i el seu bloqueig mitjançant antagonistes específics com el Rimonabant desemboca en una reducció de la ingesta dels ratolins *wild-type*¹⁸¹. Per tant, s'ha pensat en fer ús d'antagonistes del receptor CB₁ per combatre l'obesitat, però al ser un receptor que es troba altament expressat en el SNC, l'ús d'antagonistes del CB₁R com a tractament pot presentar importants efectes adversos tals com la hipotèrmia, l'analgèsia o inclús la catalèpsia¹⁸². D'altra banda, el receptor CB₂ també presenta un paper clau en l'obesitat, es tracta d'un paper antagonic al del receptor CB₁, ja que l'estimulació del receptor CB₂ amb agonistes específics desemboca en un augment del procés de *browning* i en una reducció de la ingesta calòrica. A més, l'antagonització del receptor CB₂ produeix un augment significatiu en la ingesta calòrica dels rosegadors d'estudi¹⁸³. Resumint, els diferents estudis en els que es relaciona el Sistema Cannabinoide amb la patologia d'obesitat ens plantegen la conclusió de que l'estimulació del receptor CB₁ desemboca en un caràcter pro-obesitat mentre que l'estimulació del receptor CB₂ provoca un fenotip anti-obesitat¹⁸⁴.

1.6. Les malalties neurodegeneratives

Les malalties neurodegeneratives es caracteritzen per una pèrdua progressiva i selectiva de poblacions neuronals vulnerables. Aquestes patologies poden ser classificades, tenint en compte les seves característiques clíniques, en demència, parquinsonisme o malalties neuronals motores, tenint en compte la distribució anatòmica de la neurodegeneració, en degeneració fronto-temporal, desordres extrapiramidals o degeneració espinocerebral o, per últim, tenint en compte la seva principal abnormalitat molecular¹⁸⁵. Els desordres neurodegeneratius es desenvolupen amb la desregulació d'una sèrie de processos moleculars comuns que, de manera progressiva, condueixen a la mort neuronal. Entre aquests processos s'inclou la desregulació del proteosoma, l'agregació proteica, l'augment de l'estrès oxidatiu, la neuroinflamació i la disfunció i mort neuronals (Figura 11). És evident que les malalties neurodegeneratives tenen un gran impacte econòmic i social, així que el descobriment de noves teràpies que millorin la qualitat de vida dels pacients constitueix, avui en dia, un dels reptes més importants de la nostra societat¹⁸⁶.

Una característica comú en la majoria de malalties neurodegeneratives és la pèrdua d'una correcta proteòstasi, és a dir, l'homeòstasi proteica, que s'encarrega de garantir que la concentració, el plegament i les interaccions entre les proteïnes cel·lulars siguin adequats des de la seva síntesi fins la seva degradació. La proteòstasi es troba principalment regulada pel sistema d'ubiquitinació-proteosoma i per l'autòfagia mediada per xaperones¹⁸⁷. Aquests dos mecanismes moleculars s'encarreguen de marcar i degradar les proteïnes malmeses, mal plegades o, simplement, que ja no són necessàries. Una desregulació d'aquests mecanismes produeix una acumulació i agregació de proteïnes defectuoses que són insolubles i es dipositen en l'interior o

exterior cel·lular, esdevenint altament perjudicials i nocives per la maquinària cel·lular¹⁸⁸. Els principals agregats proteics que desemboquen en patologies neurodegeneratives són els formats pel pèptid β -amiloide, la proteïna tau, l' α -sinucleïna i els agregats de la proteïna TDP-43. A més, la concentració d'aquests agregats s'incrementa durant la progressió de la malaltia i es poden transportar a altres cèl·lules veïnes, actuant així de manera similar a les proteïnes priòniques¹⁸⁹. De fet, les malalties neurodegeneratives també es poden conèixer com a proteinopaties¹⁹⁰.

La mort neuronal que apareix en les malalties neurodegeneratives també pot ser atribuïda a una activació errònia i crònica del sistema immunitari en el Sistema Nerviós Central. Està descrit que les cèl·lules immunitàries més importants del SNC són la micròglia i els astròcits. Davant de certs estímuls tant fisiològics com patològics, la micròglia passa d'un estat en repòs o *resting* a un estat activat. Concretament, s'han caracteritzat dos fenotips de micròglia activada, el fenotip pro-inflamatori o M1 i el fenotip anti-inflamatori o M2. El fenotip microglial M1 és el principal responsable dels processos de neuroinflamació crònica en el SNC i es caracteritza per una elevada producció de citocines pro-inflamatòries i d'òxid nítric, mentre que el fenotip M2 es caracteritza per la capacitat de produir citocines anti-inflamatòries i diferents factors de creixement. Així, la desregulació de la polarització del fenotip microglial suposarà una inflamació perllongada en el temps que es trasllada ràpidament a una situació de neurotoxicitat amb una gran capacitat de desembocar en neurodegeneració^{191,192}.

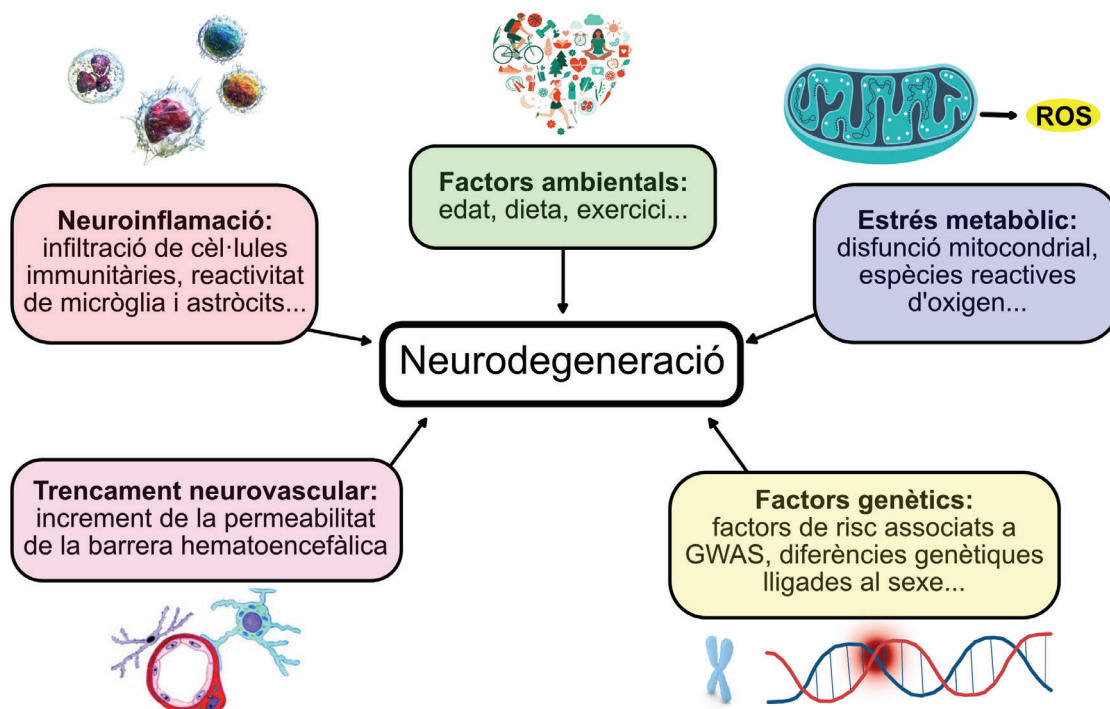


Figura 11: Principals factors desencadenants d'un procés de neurodegeneració.

Actualment, un dels principals factors limitants pel tractament d'aquestes malalties neurodegeneratives és la dificultat d'obtenir un diagnòstic en estadis primerencs, ja que això permetria un tractament personalitzat adequat i una millor evolució del quadre clínic. Hi ha diferents estudis que focalitzen la seva atenció en millorar el diagnòstic d'aquestes patologies però, els més prometedors, es basen en la identificació de biomarcadors en fluids corporals que ens permetin detectar de manera precoç les sinapsis incorrectes, el dany axonal o l'aparició de processos neuroinflamatoris^{193,194}. D'altra banda, una altra estratègia àmpliament acceptada pel diagnòstic d'aquestes malalties és la tècnica de tomografia d'emissió de positrons o PET, que ens permet detectar l'aparició de la patologia i estudiar la severitat i progressió d'aquesta¹⁹⁵.

Si entrem dins la temàtica principal d'aquesta Tesi Doctoral, cal destacar que més del 90% dels receptors acoblats a proteïna G no sensorials es troben expressats en el Sistema Nerviós Central i participen en la regulació de diversos processos neurològics importants per l'organisme. En aquest sentit, una alteració de la senyalització produïda per aquests GPCR és un factor desencadenant de nombroses malalties neurodegeneratives, entre les quals s'inclouen les malalties d'Alzheimer i Esclerosi Múltiple. D'aquesta manera, els GPCR es consoliden com a dianes terapèutiques importants per a l'estudi dels mecanismes moleculars implicats en aquestes patologies al igual que per al descobriment i desenvolupament de nous tractaments¹⁹⁶. Recentment, s'ha descrit que el sistema de l'orexina és de gran importància en patologies neurodegeneratives ja que l'activació dels seus receptors OX₁R i OX₂R, ambdós GPCRs, presenta efectes anti-inflamatoris que ajuden a pal·liar el progrés de la malaltia¹⁹⁷. Per tant, l'activació del sistema de l'orexina presenta un rol neuroprotector davant de patologies amb un component inflamatori com l'Alzheimer, l'obesitat, l'Esclerosi Múltiple, les malalties intestinals i els xocs sèptics. Tot això suggereix que els receptors d'orexina són grans dianes terapèutiques per a la investigació de nous tractaments per fer front a aquestes patologies neurodegeneratives¹⁹⁸. Un altre exemple interessant és la implicació dels receptors mGluR en la malaltia de Huntington, que és un desordre genètic autosòmic dominant en el que es repeteix el codó CAG en la seqüència d'ADN i es tradueix una proteïna no funcional anomenada huntingtina, que s'acumula en el citoplasma cel·lular provocant una alliberació crònica de glutamat que genera excitotoxicitat i mort neuronal. S'ha vist que l'activació presinàptica del receptor mGluR₂ i el bloqueig postsinàptic del receptor mGluR₅ poden inhibir l'alliberació crònica de glutamat i eradicar la excitotoxicitat. Així, el tractament conjunt amb l'agonista de mGluR₂ (LY379268) i l'antagonista de mGluR₅ (MPEP) aconsegueix reduir la hiperactivitat neuronal, pal·liant així el desenvolupament de la malaltia de Huntington¹⁹⁹. Un altre clar exemple recau en els receptors d'adenosina i dopamina, que també es troben fortament implicats en la malaltia de Huntington, ja que diversos estudis demostren que el bloqueig conjunt del receptor d'adenosina A_{2A}R i del receptor de dopamina D₁R, mitjançant el seus antagonistes específics SCH58261 i SCH23390 respectivament, afavoreix la degradació de glutamat i inhibeix la seva alliberació, reduint l'excitotoxicitat causada per l'excés d'aquest neurotransmissor i pal·liant així la progressió de la malaltia^{200,201}. En la literatura podem trobar infinitat d'exemples més en els que es demostra la implicació dels GPCR en la progressió o pal·liament de moltes malalties neurodegeneratives.

De fet, aquests receptors presenten un potencial enorme per al desenvolupament de teràpies contra aquest tipus de patologies ja que aquestes presenten una simptomatologia tant heterogènia com la varietat de GPCR implicats en aquestes malalties. Utòpicament, un bon tractament per aquestes malalties neurodegeneratives hauria de ser una combinació de diversos compostos que interaccionin amb diferents GPCR a l'hora i d'aquesta manera es podria aturar la progressió de la malaltia des de diferents nivells simultàniament²⁰².

1.6. La malaltia d'Alzheimer

A grans trets, podem definir la demència com un síndrome clínic caracteritzat per un conjunt de símptomes entre els quals trobem la pèrdua de memòria, canvis en el comportament, impediments en les activitats diàries del pacient i pèrdua de funcions cognitives. Concretament, la malaltia d'Alzheimer és una patologia neurodegenerativa progressiva que rep aquest nom degut al psiquiatra alemany Alois Alzheimer, que fou el que primer va descriure aquest desordre ja fa més de cent anys²⁰³.

1.6.1.1. Prevalença i incidència

La malaltia d'Alzheimer és actualment la causa més comú de demència, amb un percentatge superior al 60 % dels casos diagnosticats²⁰³. Actualment, hi ha més de 50 milions de persones que pateixen demència arreu del món, implicant tant regions desenvolupades com regions en desenvolupament²⁰⁴.

Epidemiològicament, diversos estudis realitzats en la població global europea, com el que van realitzar H. Niu i col·laboradors al 2016, ens indiquen que, en persones majors de 65 anys, la prevalença de la malaltia d'Alzheimer és del 5,05 %, mentre que les demències es troben al voltant d'un 7 %. A més, cal tenir en compte que es diagnostiquen uns 5 milions de casos nous d'Alzheimer cada any i, per tant, es preveu que el nombre de persones que pateixen aquesta malaltia es dupli cada 20 anys. Si parlem d'incidència en la població europea de més de 65 anys, aquesta es situa al voltant de 11,08 per cada 1000 persones-any, tenint en compte que aquesta incidència augmenta exponencialment a partir dels 85 anys d'edat. Precisament en individus majors de 85 anys, s'estima que gairebé una de cada dues persones arribarà a desenvolupar símptomes de demència²⁰⁵. Aquest augment exponencial en edats avançades, ens indica que la malaltia d'Alzheimer no deixa de ser una conseqüència inevitable de l'envelliment. A més, aquests estudis en la població europea demostren que aquesta malaltia presenta una incidència superior en dones que en homes i en països desenvolupats respecte els països en desenvolupament²⁰⁶.

Si ens centrem en les causes que poden desenvolupar aquesta patologia, cal tenir en compte que l'Alzheimer és una malaltia multifactorial de causa desconeguda, on l'envelliment és el principal factor de risc. Si ens centrem en les causes genètiques, al voltant d'un 15 % dels casos diagnosticats d'Alzheimer poden ser atribuïbles a mutacions en l'al·lel $\epsilon 4$ de l'apolipoproteïna E (APOE)²⁰⁷. No obstant, a part dels factors genètics, en trobem molts altres que tenen un paper important en l'aparició de la malaltia d'Alzheimer com, per exemple, factors metabòlics (obesitat, colesterol alt, consum

d'alcohol, hipertensió o diabetis), factors psicosocials relacionats amb l'estil de vida (estat socioeconòmic, activitat física i mental) i, per últim, altres factors etiològics com la inflamació o l'exposició a compostos tòxics com els metalls pesats²⁰⁶.

1.6.1.2. Fisiopatologia

Podem dividir la patologia d'Alzheimer en dos tipus en funció de l'aparició dels símptomes. La forma més comuna de la malaltia és l'anomenada *late-onset AD* i és la que es desenvolupa en individus majors de 65 anys, però també trobem un tipus minoritari, anomenat *early-onset AD*, que es desenvolupa en individus d'entre trenta i seixanta anys. Aquest últim tipus sol ser provocat per mutacions en els gens que codifiquen per a les proteïnes APP (*Amyloid Precursor Protein*), PS1 (*Presenelin-1*) i PS2 (*Presenelin-2*)^{208,209}.

La proteïna APP és una proteïna transmembrana que s'expressa en cèl·lules de tot l'organisme. Els seus nivells d'expressió depenen directament de l'estat fisiològic de la cèl·lula²¹⁰. La funció fisiològica d'aquesta proteïna APP encara no s'ha evidenciat, però existeixen nombroses hipòtesis que recolzen que tindria un paper rellevant en la supervivència neuronal. Durant el desenvolupament de la malaltia d'Alzheimer, aquesta proteïna APP és transportada pels axons fins als terminals presinàptics, on s'acumula fins a nivells relativament alts i, degut a un mal processament per part de les secretases específiques, resulta en dipòsits de pèptids A β en l'espai sinàptic²¹¹. Quan formen agregats insolubles, els pèptids A β estan considerats com a substàncies neurotòxiques i, avui en dia, són la causa principal de demència degut al dany neuronal que poden causar²¹². Els pèptids A β es generen durant el processament de la proteïna APP, és a dir, l'APP actua com a substrat de dos enzims diferents, l' α -secretasa i la β -secretasa, que s'encarregaran de tallar els dominis extracel·lulars de la proteïna APP generant els pèptids APP_{s α} i APP_{s β} , a partir de l'extrem N-terminal, i els fragments CTF α i CTF β , a partir de l'extrem C-terminal. Els fragments CTF α i CTF β són processats per un tercer enzim, anomenat γ -secretasa, generant els pèptids p3 i β -amiloide (A β). Mentre que el pèptid p3 és soluble i no presenta tendència a formar agregats, el pèptid A β presenta una forta predisposició a formar agregats insolubles anomenats plaques β -amiloides^{213,214}.

El pèptid β -amiloide o A β té entre 40 i 42 aminoàcids, depenent del punt exacte on la γ -secretasa produeix el trencament²¹⁵. La forma més neurotòxica és la que presenta 42 aminoàcids, ja que forma agregats que són capaços d'interaccionar amb els receptors AMPA, on s'uneix el neurotransmissor glutamat, i amb canals de Ca²⁺, incrementant considerablement el flux de l'ió Ca²⁺ cap a l'interior de la cèl·lula²¹⁶. Aquest conjunt d'efectes desemboca en apoptosi i mort cel·lular²¹¹. A més, la formació d'aquests agregats insolubles de pèptids A β iniciarà una resposta inflamatòria local que també afavorirà la posterior mort neuronal. D'altra banda, durant aquest procés de formació d'agregats insolubles, els pèptids A β produiran espècies reactives d'oxigen (ROS) que causaran la peroxidació dels lípids de les membranes neuronals, inhibint completament la funcionalitat dels transportadors de glucosa i les ATPases, que es traduirà en la pèrdua de l'homeòstasi i el metabolisme cel·lulars²¹⁷.

Paral·lelament, la formació d'aquests dipòsits de pèptid β -amiloide iniciaran una cascada d'hiperfosforilació de la proteïna tau, una proteïna estructural que reforça el citoesquelet neuronal, que perdrà la seva funció i s'acabarà acumulant en forma d'agregats tòxics que impossibilitaran la comunicació inter-neuronal. Els agregats insolubles de proteïna tau s'anomenen cabdells neurofibril·lars (Figura 12)²⁰⁹.

Per últim, és important esmentar el rol de la micròglia i els astròcits en la malaltia d'Alzheimer ja que són les cèl·lules immunitàries per excel·lència del Sistema Nerviós Central i tenen un paper rellevant en el desenvolupament de la malaltia. En mostres de pacients d'Alzheimer, trobem cèl·lules microgials i astròcits al voltant de les plaques β -amiloïdes i dels cabdells neurofibril·lars. Tant la micròglia com els astròcits, presenten un paper dual en la progressió de la patologia. En el cas de la micròglia, una activació moderada desembocarà en un atac immunològic contra els agregats nocius insolubles, mentre que una activació exagerada desembocarà en una resposta inflamatòria que afavorirà la progressió de la malaltia. D'altra banda, els astròcits són capaços de secretar factors tròfics que actuaran augmentant la supervivència i funcionalitat neuronals, com és el cas del factor GDNF, però també són capaços d'alliberar factors com el NGF, que és un compost que genera neurotoxicitat i mort neuronal i, per tant, afavoreix en la progressió de la malaltia²¹⁸. És per aquest motiu que un millor enteniment del paper de la micròglia i dels astròcits en la regulació de la patologia de l'Alzheimer és necessari per obrir un nou ventall d'estratègies terapèutiques.

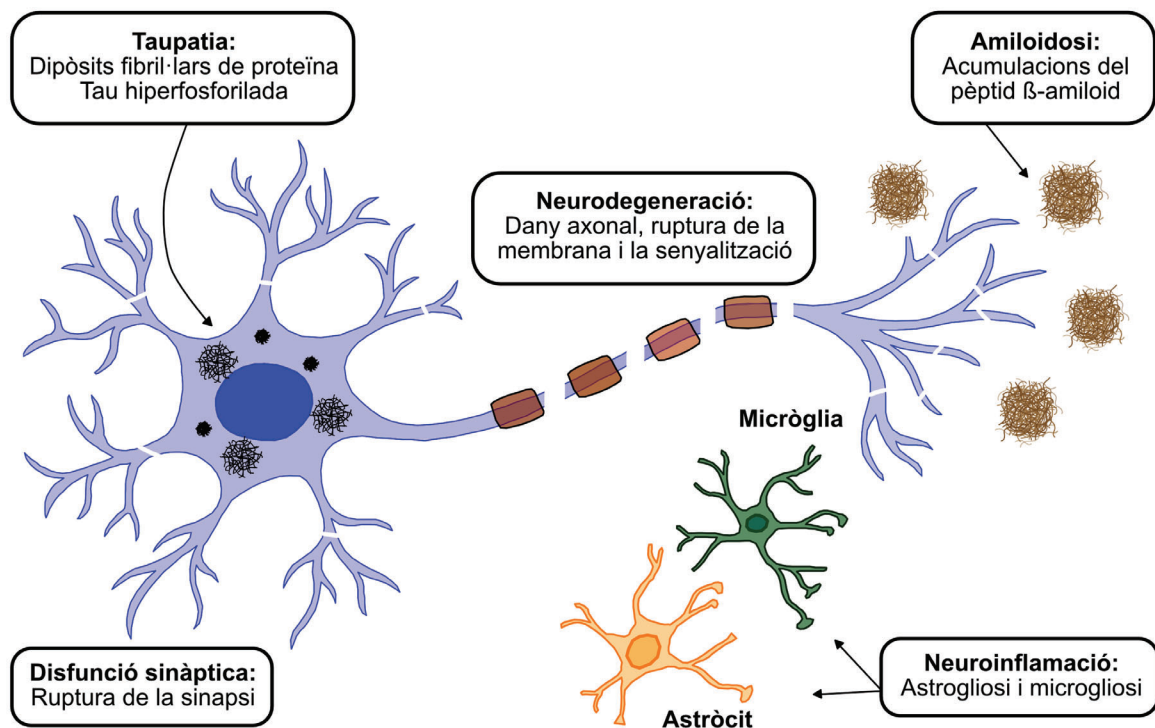


Figura 12: Representació esquemàtica de la fisiopatologia de la malaltia d'Alzheimer.

1.6.1.3. Tractaments actuals

Actualment, existeixen més fàrmacs destinats a pal·liar la simptomatologia de la malaltia que fàrmacs destinats a pal·liar la progressió d'aquesta. En aquest sentit, és necessari continuar la investigació per acabar descobrint un tractament que curi la malaltia d'Alzheimer. Per tal d'identificar i aconseguir desenvolupar un possible tractament per fer front a aquesta patologia, tenint en compte la complexa fisiopatologia que presenta, les vies de senyalització en les que podríem incidir són les següents: la inhibició de les secretases α , β i γ per tal de reduir la formació de pèptids β -amiloides, la inhibició de les quinases que fosforilen la proteïna tau, la utilització de compostos capaços de dissoldre les plaques β -amiloides i els cabdells neurofibril·lars, l'augment de la producció d'acetilcolina per millorar les funcions cognitives dels pacients o, en darrer lloc, intentar atacar els factors de risc, com poden ser patologies metabòliques tals com la diabetis de tipus II²¹⁹.

Avui en dia, la majoria dels fàrmacs aprovats per la FDA (*Food and Drug Administration*) contra l'Alzheimer únicament han demostrat tenir efectes positius en la millora de les habilitats cognitives dels pacients, però en cap cas inhibeixen la progressió de la malaltia²²⁰. Els cinc fàrmacs que tenen l'aprovació de la FDA com a tractament per a l'Alzheimer són el Donepezil, la Rivastigmina, la Galantamina, el Memantine i el Namzaric, essent aquest últim una combinació de Donepezil i Memantine²²¹. Els tres primers són inhibidors de l'acetilcolinesterasa, ja que inhibint aquest enzim s'aconsegueix més disponibilitat d'acetilcolina en les sinapsis i així, s'aconsegueix millorar el fenotip cognitiu del pacient. En contraposició, el fàrmac Memantine antagonitza el receptor NMDA, impedit la unió del glutamat i reduint el flux d'ió Ca^{2+} cap a l'interior de la neurona. D'aquesta manera s'evita la neurotoxicitat. Per tant, el Memantine presenta efectes neuroprotectors i millora la simptomatologia del pacient^{209,222}.

Un cop descrits els fàrmacs aprovats per la FDA, és important destacar diferents estratègies de recerca que s'estan seguint en l'actualitat per tal d'identificar i sintetitzar nous tractaments capaços d'aturar la progressió de la malaltia:

- Teràpies centrades en el pèptid β -amiloide: la immunoteràpia podria ser una molt bona opció, ja que es pot aconseguir una immunització activa mitjançant vacunes antigèniques que fan que els pèptids β -amiloides siguin reconeguts i atacats pel propi sistema immunitari del pacient^{223,224}. Un gran inconvenient d'aquest tractament podria ser el desenvolupament d'una resposta autoimmune nociva pel propi organisme²²⁵. Un altre tipus de teràpia centrada en el pèptid β -amiloide podria ser la inhibició de les secretases. En aquest cas ens trobarem amb menys efectes adversos que la immunoteràpia. Compostos com la myricetina i la neocoylina han demostrat ser bons inhibidors de la β -secretasa i es troben actualment en estadis pre-clínic²²⁶. Malauradament, existeixen compostos inhibidors de la γ -secretasa però, en aquest cas, no han mostrat resultats prometedors ja que la γ -secretasa es troba implicada en molts més processos fisiològics que la β -secretasa i el fet d'inhibir-la és molt més perillós²²⁷.

Una altra estratègia podria consistir en centrar-nos en la inhibició de la formació d'agregats, ja que compostos com la curcumina han demostrat que pal·lien la capacitat d'agregació d'aquests pèptids insolubles. Per últim, una altra bona opció seria centrar-se en la degradació dels agregats β -amiloides nocius mitjançant compostos fenòlics presents en el vi com el resveratrol²²⁸.

- Teràpies centrades en la proteïna tau: s'ha descrit que una immunització activa contra la proteïna tau té efectes altament neurotòxics²²⁹ i, per tant, cal buscar altres estratègies com la inhibició de la fosforilació de la proteïna mitjançant l'ús d'inhibidors de les quinases Cdk5 i Gsk3. No obstant, els assajos clínics amb aquests inhibidors no han demostrat una eficàcia farmacològica important²¹³. Una nova estratègia consistiria en l'estabilització del citoesquelet cel·lular per tal de contrarestar l'efecte de la formació dels cabdells neurofibril·lars. Finalment, les investigacions actuals també es centren en la inhibició de l'agregació de la proteïna tau mitjançant compostos específics com alguns flavonoids²³⁰.

- Altres estratègies: la formació d'agregats insolubles desencadena en una hiperactivació dels canals de Ca^{2+} , que acaba conduint a la mort neuronal. Compostos com la nilvadipina, que són capaços d'inhibir aquests canals, ens ajudaran a prevenir la neurotoxicitat causada per un augment descontrolat en la concentració d'ió Ca^{2+} intracel·lular²³¹. Finalment, l'ús d'agents anti-inflamatoris també pot esdevenir una bona teràpia, ja que la formació d'aquests agregats proteics provoca una greu inflamació local que condueix a la mort neuronal²³².

1.6.2. L'Esclerosi Múltiple

La patologia d'Esclerosi Múltiple és un desordre inflamatori crònic del Sistema Nerviós Central que normalment afecta a individus d'entre 20 i 40 anys. Es caracteritza per una desmielinització neuronal progressiva que desemboca en neurodegeneració i dany axonal. La seva incidència i prevalença s'estén a nivell mundial. Les àrees on trobem més individus afectats són les regions d'Europa i Amèrica del Nord. D'altra banda, la seva etiologia exacta segueix sense ésser evident del tot, però el que està clar és que es tracta d'una desregulació immunològica resultat d'interaccions entre predisposicions genètiques i factors ambientals²³³.

1.6.2.1. Prevalença i incidència

L'Esclerosi Múltiple es considera la causa principal de disfunció neurològica no-traumàtica en adults joves. El nombre estimat d'individus que pateixen la malaltia a nivell mundial ha incrementat un 10 % des de 2008, fins a un total de 23 milions de persones afectades en tot el món. L'augment progressiu de la prevalença d'aquesta patologia es pot atribuir parcialment a l'aparició de la tècnica de ressonància magnètica per imatges (MRI), ja que permet un diagnòstic fàcil en estadis primerencs. Cal tenir en compte que l'Esclerosi Múltiple es troba present en totes les regions del món i la seva prevalença varia considerablement, essent aquesta més elevada a Amèrica del Nord i Europa, amb uns valors de 140 i 108 casos per cada 100000 habitants, respectivament.

Els valors de prevalença més baixos a nivell mundial els trobem al sud d'Àfrica i a l'est d'Àsia, amb 2,1 i 2,2 casos per cada 100000 habitants respectivament²³⁴.

Les diferències geogràfiques i ètniques són factors importants en el desenvolupament de l'Esclerosi Múltiple, ja que l'exposició solar és un factor de risc i hàbits culturals tals com vestir-se amb roba que protegeixi de l'exposició solar han contribuït considerablement a establir aquestes diferències en la prevalença entre diferents regions²³⁵. Depenent del país, el rati d'incidència entre dones i homes varia entre 1,5:1 i 2,5:1, ja que està àmpliament descrit que les dones són més susceptibles a desenvolupar desordres autoimmunes degut a les oscil·lacions hormonals. D'altra banda, l'edat també és un factor important en el desenvolupament de la patologia, ja que se segueix un mateix patró d'evolució independentment del sexe o la regió i apareix un elevat pic d'incidència en adults joves d'entre 25 i 35 anys²³⁶.

1.6.2.2. Fisiopatologia

L'Esclerosi Múltiple és una malaltia autoimmune provocada, principalment, per les cèl·lules T activades, amb una contribució significativa de les cèl·lules B. L'atac immunològic es concentra en l'activació perifèrica d'aquestes cèl·lules T auto-reactives que actuaran contra diversos antígens presents en les baines de mielina de les dendrites neuronals²³⁷. Aquestes cèl·lules T auto-reactives són capaces de creuar la barrera hematoencefàlica, on seran activades per cèl·lules presentadores d'antigen locals, com cèl·lules dendrítiques, macròfags i cèl·lules B²³⁸. D'aquesta manera, s'inicia una cascada inflamatòria on s'alliberen nombroses citocines i quimiocines, es recluten cèl·lules T addicionals, monòcits i cèl·lules B, que desemboca en una pèrdua pronunciada d'oligodendròcits i en la degradació progressiva de les baines de mielina que possibiliten l'impuls elèctric i la comunicació entre neurones²³⁹. A part de la desmielinització, també apareix un important dany axonal concentrat en els estadis més primerencs de la cascada inflamatòria, iniciat per l'activació persistent dels macròfags i la micròglia i els efectes indirectes produïts per tots els factors pro-inflamatoris alliberats tals com les citocines pro-inflamatòries, l'òxid nítric i el TNF- α ^{239,240}. Es coneix que les cèl·lules B tenen un paper important en el desenvolupament de la malaltia, perquè s'han identificat fol·licles de cèl·lules B en les meninges de pacients amb Esclerosi Múltiple Secundària Progressiva (EMSP)²⁴¹. A més, la implicació de les cèl·lules B en la patologia es confirma amb l'èxit que han assolit les noves teràpies immunològiques basades en cèl·lules B (Figura 13)²⁴².

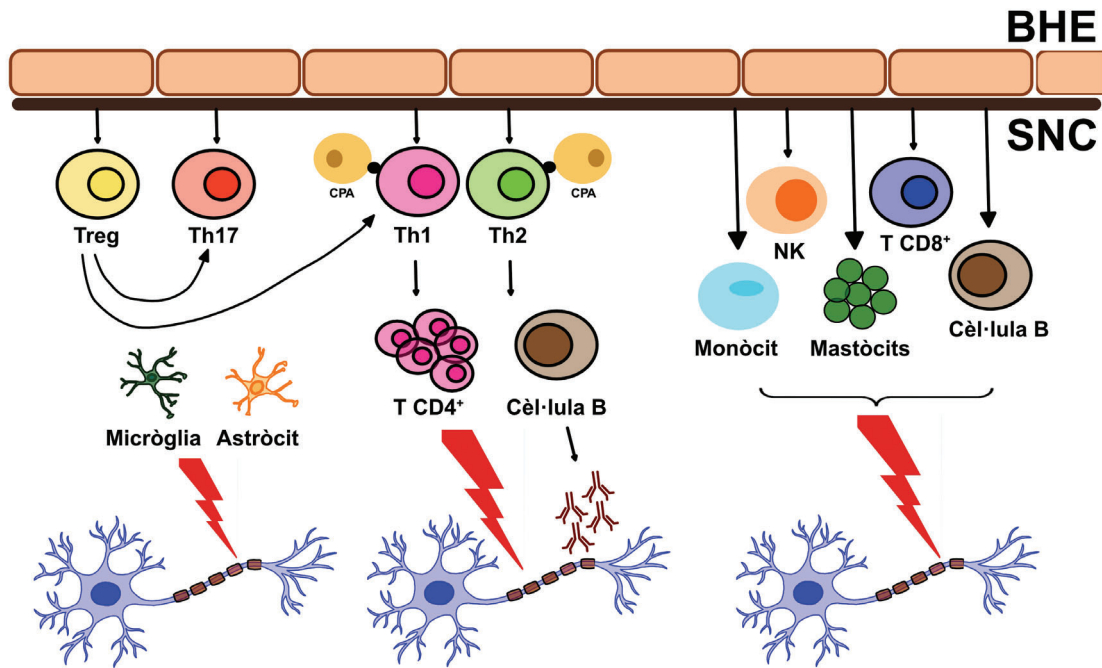


Figura 13: Representació gràfica de la fisiopatologia de l'Esclerosi Múltiple.

L'Esclerosi Múltiple és una malaltia que presenta predisposició genètica, ja que no mostra un clar patró d'herència entre pares i fills, però el risc de patir la malaltia quan un familiar de primer grau ja la presenta és deu vegades més elevat, passant del 0,2% al 2%²⁴³. L'al·lel HLA-DR2 present en el cromosoma 6p21 és l'únic que ha demostrat estar significativament associat amb el risc genètic de patir Esclerosi Múltiple²⁴⁴. Per tant, el risc de patir aquesta malaltia el determinarà una combinació entre predisposició genètica i diversos factors ambientals, entre els quals és important destacar el dèficit de vitamina D, ser fumador o el fet d'haver patit una prèvia infecció amb el virus d'Epstein-Barr²⁴⁵. L'etiologia de la malaltia segueix manifestant certa controvèrsia, ja que certs estudis han demostrat que la prevalença de l'Esclerosi Múltiple és molt més gran en regions on hi ha una menor exposició solar²⁴⁶ i altres estudis relacionen uns alts nivells de vitamina D amb un possible rol protector davant el desenvolupament d'aquesta patologia²⁴⁷. Altres factors ambientals que es consideren determinants en l'aparició de la malaltia són la microbiota intestinal, el mes de naixement i el fet d'haver pres píndoles anticonceptives^{248,249}.

Fenotípicament, la patologia d'Esclerosi Múltiple es pot manifestar de diferents maneres, ja que els seus símptomes clínics són molt variables i heterogenis entre els pacients. Els símptomes més comuns en estadis primerencs són el deteriorament cognitiu, la incontinència urinària, la fatiga, l'espasticitat muscular i la pèrdua de l'equilibri²⁵⁰. A més, podem diferenciar entre dos tipus principals d'aquesta malaltia depenent de les seves manifestacions fenotípiques. La forma més comú és l'Esclerosi Múltiple *relapsing-remitting* o Esclerosi Múltiple de brots, que conté el 85% dels casos diagnosticats i es caracteritza per l'aparició de diversos brots de la malaltia separats per períodes d'estabilitat. Aquests brots es troben directament relacionats amb l'evolució de la patologia, sobretot en els primers 5 anys, ja que més endavant, els pacients van acumulant disfuncions residuals irreversibles^{251,252}.

L'altre manifestació fenotípica és l'Esclerosi Múltiple Primària Progressiva, que comprèn el 15% dels casos diagnosticats. En aquest cas, el pacient presenta un empitjorament progressiu diari de la simptomatologia, sense oscil·lacions entre brots ni períodes d'estabilitat. Aquest tipus minoritari es caracteritza per aparèixer en edats més avançades i es manifesta més en homes que en dones²⁵⁰.

En darrer lloc, és important destacar que el diagnòstic de l'Esclerosi Múltiple es basa en la realització de tests paraclítics tals com la ressonància magnètica per imatges (MRI), que ens serveix per identificar lesions en el Sistema Nerviós Central o l'anàlisi del líquid cefaloraquídi, que ens serveix per determinar biomarcadors d'inflamació que es troben presents en més del 85% del pacients amb Esclerosi Múltiple²⁵³.

6.2.3. Tractaments actuals

Actualment, hi ha diferents línies d'investigació obertes per tal d'identificar i desenvolupar noves teràpies que siguin capaces d'aturar la progressió de la malaltia. Entre elles, les que presenten resultats més prometedors i seria interessant destacar són les següents:

- Combinació d'IFN- β i acetat de glatiramer (GA): és una teràpia combinada que utilitza l'IFN- β per modular l'activació de cèl·lules T i B i la secreció de citocines i el GA per modular la funció de les cèl·lules T reguladores. Aquesta teràpia ha demostrat una eficàcia moderada, reduint l'aparició de brots i la progressió de la malaltia en un 30% dels casos²⁵⁴.

- Teriflunomida: es tracta d'un inhibidor reversible de l'enzim mitocondrial dihidrorotat deshidrogenasa (DHODH), que és un enzim que promou una ràpida proliferació de cèl·lules immunològiques. Per tant, la seva inhibició pot pal·liar la cascada immunològica^{255,256}.

- Dimetil fumarat: es tracta d'una medicació administrada per via oral que ha estat aprovada per la FDA pel tractament de l'Esclerosi Múltiple *relapsing-remitting*. La seva funció consisteix en promoure l'alliberació de compostos antiinflamatoris i citoprotectors de la via de senyalització Nrf2, un important factor antioxidant²⁵⁷.

- Fingolimod: es tracta d'un modulador del receptor S1P que inhibeix la migració de les cèl·lules T des dels limfonodes, reduint la infiltració d'aquestes cèl·lules auto reactives al SNC. Actualment, aquest compost es troba en fase clínica II pel tractament de l'Esclerosi Múltiple *relapsing-remitting*^{258,259}.

- Anticossos monoclonals recombinants: el Natalizumab va ser el primer tractament d'aquest grup en ser aprovat per la FDA per combatre l'Esclerosi Múltiple *relapsing-remitting*. Es tracta d'una molècula d'adhesió selectiva que inhibeix el flux de cèl·lules inflamatòries en el SNC²⁵⁴. Un altre exemple és l'Alemtuzumab, que actua sobre la proteïna de membrana CD52, que s'expressa a nivells molt elevats en limfòcits T i B, pal·liant així, considerablement, la seva capacitat migratòria²⁶⁰.

Per últim, és important parlar de l'Ocrelizumab, que és un compost que reacciona amb la proteïna de membrana CD20 dels limfòcits B. Actualment, és l'únic tractament aprovat per la FDA per tractar les dues manifestacions fenotípiques de l'Esclerosi Múltiple²⁶¹.

En conjunt, podem afirmar que l'Esclerosi Múltiple *relapsing-remitting* o de brots presenta diversos tractaments que permeten augmentar la durada dels períodes d'estabilitat i evitar l'aparició de brots, essent molt important aplicar aquestes teràpies en estadis primerencs del desenvolupament de la malaltia per tal de reduir la inflamació i la pèrdua axonal en el Sistema Nerviós Central. Pel tractament d'aquesta manifestació fenotípica de la malaltia, s'han aprovat l'IFN- β , l'acetat de glatiramer i la teriflunomida com a teràpies de primera línia. D'altra banda, el Fingolimod s'ha aprovat a Europa com a teràpia de segona línia, de la mateixa manera que els anticossos monoclonals Natalizumab i Alemtuzumab. Destacar que diversos estudis demostren que la combinació de teràpies de primera i de segona línia és la millor estratègia per fer front a l'Esclerosi Múltiple de brots²⁶².

Paral·lelament, el tractament de l'Esclerosi Múltiple primària progressiva és molt més complex i, malauradament, no existeix cap tractament significativament efectiu, però s'estan obtenint resultats positius en estudis recents. Els anticossos monoclonals recombinants com l'Ocrelizumab han demostrat una reducció del 25% en la progressió constant de la malaltia en comparació amb el grup administrat amb placebo²⁶¹. D'altra banda, estudis amb altres anticossos monoclonals com el Rituximab no han mostrat cap millora significativa respecte el grup control²⁶³. Altres compostos com la biotina, també coneguda com vitamina H o B7, és un cofactor que afavoreix la síntesi d'àcids grassos i la reparació de les baines de mielina, però els assajos clínics realitzats no han obtingut la eficàcia que s'esperava²⁵⁴. Per últim, és important destacar el compost mitoxantone, que és un agent citotòxic que s'intercala en l'ADN i té la capacitat d'inhibir la topoisomerasa II implicada en la reparació de l'ADN, fet que aconsegueix pal·liar notablement la proliferació de les cèl·lules immunitàries que inicien la cascada de senyalització²⁶⁴.

1.7. Els receptors d'adenosina

L'adenosina és un nucleòsid endogen format per una base purínica i un anell de ribosa. Es tracta d'una molècula que és produïda per pràcticament totes les cèl·lules de l'organisme humà i participa activament en nombrosos processos fisiològics tals com la regulació de la fase son-vigília, la vasodilatació, l'estimulació de la captació de glucosa o la inhibició de la lipòlisi, incrementant la disponibilitat de substrats metabòlics per a l'organisme^{265,266}. Tant l'adenosina com els seus derivats són constituents essencials per a tota cèl·lula viva, ja que conformen peces clau per a la formació de diverses molècules biològiques tant rellevants com els àcids nucleics, els nucleòtids ATP i AMP o el cofactor NAD⁺, convertint-se en una peça clau en el control del balanç energètic cel·lular²⁶⁷.

En condicions fisiològiques, els nivells d'adenosina tant extracel·lulars com intracel·lulars es troben dins del rang de nanomolar (nM), però davant de situacions de dany o estrès cel·lular, aquests valors poden augmentar fins arribar al rang de milimolar (mM). La concentració d'adenosina extracel·lular està regulada per l'enzim adenosina desaminasa (ADA), que s'encarrega de la degradació de l'adenosina extracel·lular produint inosina²⁶⁸. D'altra banda, quan la concentració extracel·lular d'adenosina disminueix, l'ectonucleotidasa CD39 s'encarrega de trencar l'ATP en ADP, que és convertit en adenosina per acció de l'ectonucleotidasa CD73²⁶⁹. És d'aquesta manera com el nostre organisme regula la biodisponibilitat d'aquest nucleòsid. És important tenir en compte que l'adenosina no és permeable a la membrana plasmàtica i, per tant, necessita de transportadors específics, essent els més importants els ENTs (transportadors de nucleòsids equilibradors) i els CNTs (transportadors de nucleòsids concentratius). Els CNTs fan servir gradients de sodi per concentrar unidireccionalment l'adenosina a l'interior de la cèl·lula, mentre que els ENTs tenen la capacitat d'importar i exportar adenosina de la cèl·lula de manera bidireccional²⁷⁰.

En mamífers, l'expressió dels receptors d'adenosina és molt més abundant en el cervell que en altres teixits i tipus cel·lulars i, és per aquest motiu, que és molt important estudiar i determinar les nombroses funcions de l'adenosina en el SNC²⁷¹. En el Sistema Nerviós Central, l'adenosina secretada per neurones i cèl·lules glials actua com a modulador tant a nivell presinàptic com a nivell postsinàptic i extrasinàptic. Aquest nucleòsid participa, doncs, en el control de l'alliberació de neurotransmissors excitatoris, en la inhibició de l'activitat motora espontània, en la regulació de la diferenciació i la migració neuronal, en la modulació de la funció respiratòria i en el control de processos com la plasticitat sinàptica, la son, l'ansietat i la depressió²⁷²⁻²⁷⁵.

L'adenosina és capaç de dur a terme les seves funcions mitjançant la unió als receptors d'adenosina, receptors GPCR que pertanyen a la família *rhodopsin-like* o de classe A²⁷⁶. Els GPCR capaços d'unir adenosina han estat classificats en funció de les seves propietats moleculars, bioquímiques i farmacològiques en quatre subtipus: els receptors d'alta afinitat per l'adenosina, que són els receptors A₁ i A_{2A} i els receptors de baixa afinitat per l'adenosina, essent els receptors A_{2B} i A₃. Aquesta diferent afinitat per l'adenosina és molt rellevant a nivell fisiològic, on la concentració d'adenosina és molt heterogènia, d'entre 30 nM i 980 nM segons la regió cerebral i estat de l'organisme, i per tant, l'organisme pot realitzar una diferent regulació funcional en funció de la concentració endògena del nucleòsid²⁷⁷. El grau d'homologia entre els receptors d'adenosina és relativament baix i es situa al voltant del 60%. No obstant, a nivell estructural, s'ha descrit que els tres dominis extracel·lulars i els dominis transmembrana 3 i 7 es troben altament conservats en els quatre subtipus de receptors d'adenosina i són claus per a la unió a lligand²⁷⁸. De la mateixa manera que la majoria dels GPCR, les regions que presenten una major homologia es troben en els dominis transmembrana²⁷⁹.

Majoritàriament, són els receptors que presenten alta afinitat per l'adenosina, el receptor A₁ i el receptor A_{2A}, els principals responsables dels efectes d'aquest nucleòsid en el SNC, essent el receptor A₁ el que presenta nivells d'expressió més elevats i amb una distribució molt extensa per tot el cervell.

Per un altre costat, el receptor A_{2A} presenta nivells d'expressió molt elevats però únicament en una regió cerebral molt concreta anomenada ganglis basals²⁸⁰. Els receptors A_{2B} i A_3 , que presenten baixa afinitat per l'adenosina, tindran una implicació important en aquelles condicions en les que es vegi incrementada la concentració d'aquest nucleòsid de manera notòria (Figura 14). A nivell perifèric, la distribució dels receptors d'adenosina també és molt àmplia i aquests receptors s'expressen per tots els teixits i òrgans del cos, esdevenint grans dianes terapèutiques per al tractament de diverses patologies. No obstant, aquesta àmplia distribució per tot l'organisme dificulta el desenvolupament de fàrmacs específics que actuïn únicament en els teixits afectats, apareixent greus efectes secundaris degut a la unió a receptors d'adenosina presents en zones de l'organisme no afectades^{281,282}.

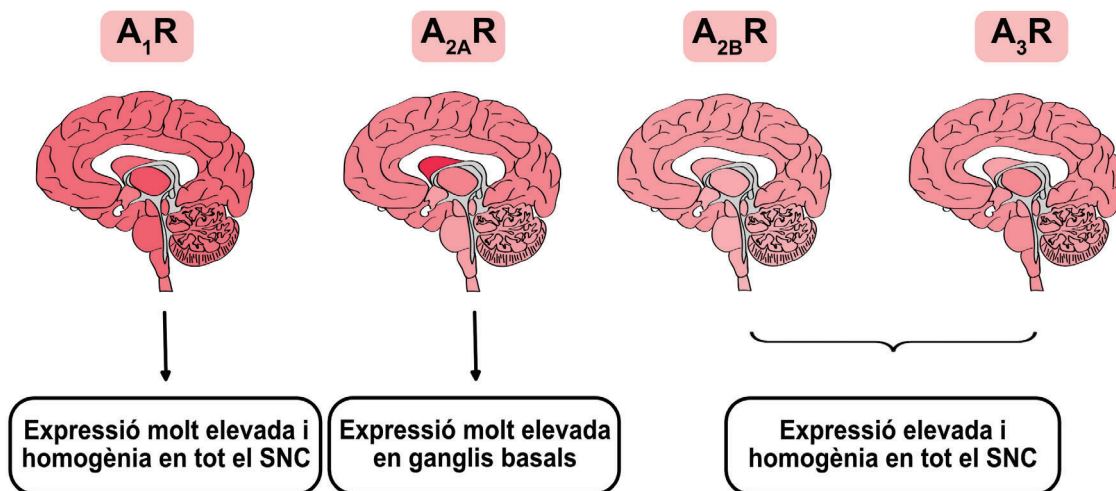


Figura 14: Expressió dels receptors d'adenosina en el Sistema Nerviós Central.

L'adenosina és l'agonista endogen de tots els seus receptors i com a tal, actua com a agonista total. Malauradament, no és una bona eina per a l'estudi d'aquests receptors degut a la seva alta susceptibilitat a ser metabolitzada per diferents enzims. No obstant, l'adenosina és la base estructural de tots els agonistes descrits. Les metil-xantines constitueixen l'estructura bàsica sobre la qual s'han dissenyat la majoria d'antagonistes d'aquests receptors, donant lloc a una elevada selecció de derivats, molts dels quals presenten una gran selectivitat per algun subtipus d'aquests receptors²⁸³.

El nucleòsid de l'adenosina no es considera un neurotransmissor però comparteix moltes propietats atribuïdes al principal neurotransmissor inhibitori, l'àcid γ -aminobutíric (GABA). Així, el GABA i l'adenosina es consideren les principals molècules en el control de la transmissió sinàptica glutamatèrgica. Per un costat, l'adenosina és capaç d'inhibir l'alliberació de glutamat mitjançant l'activació dels receptors A_1 , fet que permet desconectar fisiològicament les neurones gabaèrgiques²⁸⁴. Aquesta inhibició regula, per exemple, el cicle son-vigília, promovent la fase de la son. És per aquest motiu que la cafeïna, antagonista del receptor A_1 , contraresta l'efecte de l'adenosina sobre els receptors A_1 i indueix un estat de vigília^{285,286}.

Degut a la gran varietat de funcions que presenta l'adenosina a nivell del SNC, és fàcil suposar que els diferents subtipus de receptors d'adenosina activaran diferents vies de senyalització intracel·lular. Així, els receptors A_1 i A_3 s'acoblen a la proteïna G_i provocant la inhibició de l'enzim adenilat ciclasa i produint una conseqüent disminució dels nivells d'AMPc intracel·lulars²⁷⁷, mentre els receptors A_{2A} i A_{2B} s'acoblen a la proteïna G_s , augmentant els nivells d'AMPc intracel·lulars (Figura 15)²⁸⁷. També s'ha descrit la capacitat dels receptors A_{2B} i A_3 per senyalitzar mitjançant l'acoblament a proteïna G_q , activant la fosfolipasa C i afavorint l'alliberació de calci intracel·lular^{288,289}. És important destacar que tots els receptors d'adenosina són capaços d'activar a les *Mitogen Activated Protein Kinases* (MAPK), induint la fosforilació de les *Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2* (ERK1/2) mitjançant les subunitats β/γ de la proteïna G ²⁹⁰. Com la majoria dels GPCR, els receptors d'adenosina pateixen un procés de dessensibilització després de períodes d'activació perllongats. Aquest procés es troba mediat per la fosforilació, mitjançant les quinases GRKs (*G protein coupled receptor kinases*), de l'extrem C-terminal dels receptors, reclutant les β -arrestines per la seva posterior internalització. Pel receptor A_1 , aquest procés d'internalització es produeix de manera lenta. En contraposició, pels receptors A_{2A} i A_{2B} és un procés més ràpid i pel receptor A_3 , és pràcticament immediat, després de pocs minuts de la seva activació²⁹¹.

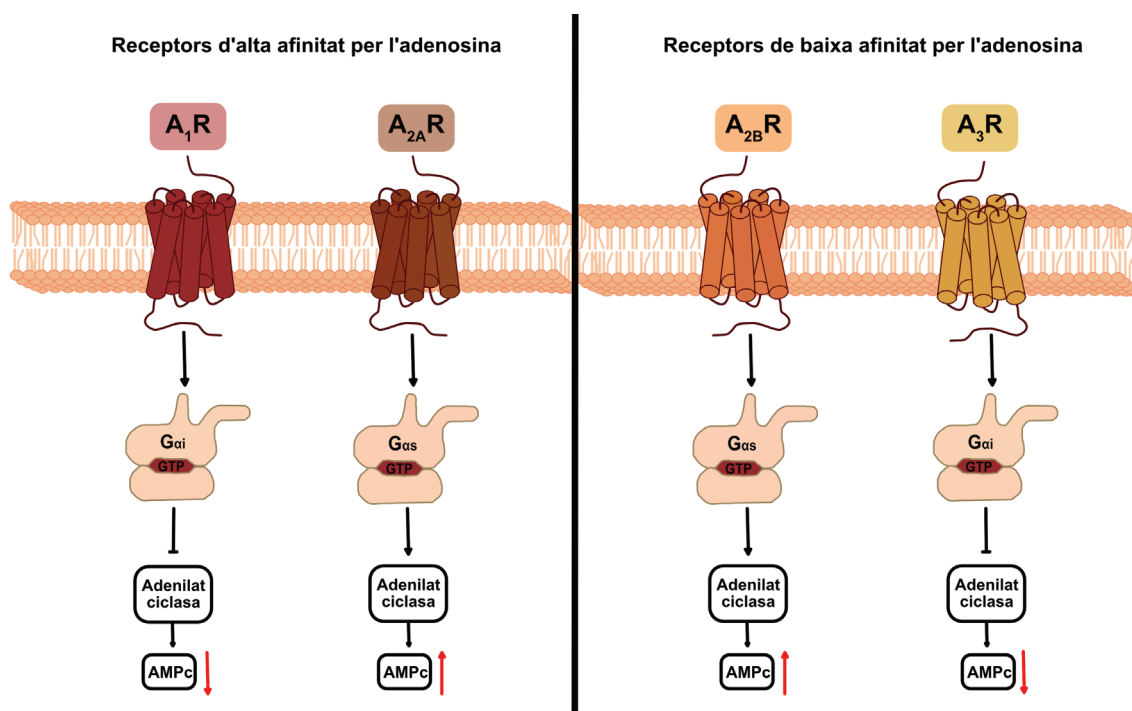


Figura 15: Representació gràfica de la transducció de senyal induïda pels diferents subtipus de receptors d'adenosina.

Si ens centrem en els processos de neurodegeneració, les investigacions es focalitzen en l'activació del receptor A_1 mitjançant agonistes específics^{292,293} o bé en el bloqueig del receptor A_{2A} mitjançant antagonistes²⁹⁴ per tal de millorar la simptomatologia en un estadi de neurodegeneració. De fet, el primer antagonista del receptor A_{2A} aprovat en teràpia va ser el compost *istradefylline*; demostrant potenciar la senyalització dopaminèrgica en la malaltia de Parkinson^{295,296}.

D'altra banda, a nivell del sistema cardiovascular, s'ha observat que l'activació dels receptors A_1 i A_3 contribueix en la reducció del ritme cardíac, mentre que l'activació del receptor A_{2A} augmenta el nombre de pulsacions per minut. A més, s'ha observat que els receptors d'adenosina tenen un paper determinant en la regulació de l'angiogènesi i la vasculogènesi. Per aquests motius, els receptors d'adenosina es presenten com una diana terapèutica interessant pel tractament de certes patologies cardíques. De fet, s'ha descrit que l'activació del receptor A_1 mostra un gran efecte tant cardioprotector com antiinflamatori²⁹⁷. En conclusió, actualment trobem nombrosos estudis que, mitjançant la caracterització funcional d'aquests receptors d'adenosina, pretenen millorar la qualitat de vida de milions de persones fent front a una gran quantitat de patologies diverses.

1.7.1. El receptor d'adenosina $A_{2A}R$

El receptor A_{2A} ha estat àmpliament estudiat i posseeix una gran varietat de lligands capaços d'unir-se a ell. Actualment, trobem molts estudis que es basen en el descobriment de lligands potents i selectius per aquest receptor, ja que s'ha vist que tenen gran potencial terapèutic per combatre diverses patologies²⁹⁸⁻³⁰⁰. El disseny d'agonistes del receptor A_{2A} té com objectiu principal combatre malalties com l'asma i el dolor neuropàtic³⁰¹, mentre que el desenvolupament d'antagonistes d'aquest receptor es troba més enfocat cap al tractament de malalties neurodegeneratives i el càncer³⁰².

L' $A_{2A}R$, com a GPCR, presenta una estructura de set dominis transmembrana d'entre 25 i 27 aminoàcids que estan connectats mitjançant *loops* intracel·lulars i extracel·lulars. L'extrem N-terminal del receptor es troba situat a l'espai extracel·lular i és particularment important per la unió del lligand. Actualment, trobem disponibles diverses estructures cristal·litzades del receptor A_{2A} , que s'han obtingut mitjançant cristal·lografia de raigs X i són una eina clau pel desenvolupament de nous compostos per a aquest receptor³⁰³⁻³⁰⁶. Aquests assajos també han permès demostrar l'existència d'una "butxaca al·lostèrica", anomenada *sodium ion pocket*, degut al fet de detectar una elevada concentració d'ions sodi en aquest espai. Aquest *sodium ion pocket* es troba altament conservat en tota la família de GPCRs i, és un punt clau en el desenvolupament de moduladors al·lostèrics del receptor A_{2A} , obrint un nou camí en la investigació de lligands, més enllà dels tradicionals agonistes i antagonistes que s'uneixen al centre ortostèric¹⁶².

El receptor A_{2A} s'expressa a diferents nivells en una gran varietat de teixits. No obstant, l'àrea del SNC on és més abundant la seva expressió són les neurones presents en els ganglis basals, concretament en l'estriat²⁹⁰. A nivell perifèric també s'expressa als pulmons, ronyons, vasos coronaris, aorta i fetge³⁰⁷. Quan s'activa, s'acobla a una proteïna G_s , estimulant l'enzim adenilat ciclasa i produint un conseqüent augment dels nivells d'AMPC intracel·lulars. Aquest AMPC actuarà com a segon missatger activant la proteïna quinasa A (PKA), que generarà diverses respostes cel·lulars. Entre elles, la més rellevant serà l'activació per fosforilació de CREB, que és un factor de transcripció que actuarà modulant l'expressió gènica. Entre d'altres, inhibirà l'expressió de NF- κ B, un factor nuclear altament implicat en la inducció d'una resposta inflamatòria³⁰⁸.

Els agonistes més importants del receptor A_{2A} es basen en l'esquelet molecular del nucleòsid d'adenosina³⁰⁹. De fet, s'ha descrit que les modificacions en el carboni situat en la posició 2 (C2) com per exemple, l'addició de grups amí, ofereixen als compostos una major selectivitat pel receptor A_{2A} . La disponibilitat d'estructures cristal·litzades del receptor en presència d'agonistes específics ha donat llum a les interaccions que es produeixen entre els lligands i el centre ortostèric³¹⁰. Per exemple, l'estructura cristal·litzada del receptor A_{2A} juntament amb el seu agonista específic, el CGS21680, ha ajudat enormement a entendre les bases moleculars per tal de dissenyar agonistes específics i selectius per a aquest receptor³⁰³. En el cas dels antagonistes, existeix una diversitat estructural entre lligands molt superior que en el cas dels agonistes³¹¹. Principalment, els compostos es basen en l'esquelet d'adenines i xantines que presenten afinitat i selectivitat pel receptor A_{2A} ³⁰⁷. Entre tots els antagonistes, és important destacar *l'istradefylline*, aprovat per la FDA pel tractament del Parkinson, que s'ha desenvolupat sobre l'esquelet molecular de les xantines i presenta una K_i de 36 nM sobre el receptor A_{2A} . Estudis recents s'estan centrant en el desenvolupament de compostos amb comportament dual, que són capaços d'antagonitzar el receptor A_{2A} al mateix temps que realitzen una funció paral·lela, com és el cas d'alguns compostos que són capaços d'antagonitzar $A_{2A}R$ mentre activen el receptor dopaminèrgic D_2 . De fet, aquests compostos han demostrat ser doblement potents en el tractament de la malaltia de Parkinson²⁹⁹. Finalment, és important destacar l'existència de diversos moduladors alostèrics capaços d'unir-se a la *sodium ion pocket* i modular positivament o negativament l'activació de l' $A_{2A}R$ ³¹²⁻³¹⁴.

Davant processos d'inflamació, el receptor A_{2A} presenta un comportament dual. Per un costat, la seva activació mitjançant la via dependent de proteïna G finalitzarà amb la inhibició de l'expressió de $NF-\kappa B$, un potent factor pro-inflamatori i, per tant, presentarà un caràcter antiinflamatori³¹⁵. A més, l'activació d' $A_{2A}R$ afavoreix la producció de IL-10, una interleuquina amb propietats antiinflamatòries³¹⁶. No obstant, l'ús d'antagonistes com *l'istradefylline* poden reduir la simptomatologia de diverses malalties neurodegeneratives com la malaltia del Parkinson³¹⁷. És més, l'antagonització del receptor A_{2A} produeix la inhibició de l'enzim MAO, que s'encarrega del catabolisme de la dopamina. Per tant, si s'inhibeix aquest enzim, s'augmenta de manera indirecta la biodisponibilitat de dopamina i es millorarà l'evolució de la malaltia del Parkinson³¹⁸. La cafeïna, un altre antagonista d' $A_{2A}R$, també mostra certa capacitat neuroprotectora, ja que el seu consum és inversament proporcional al risc de patir qualsevol tipus de demència³¹⁹. Per tot això, és important seguir endavant amb la investigació del comportament d' $A_{2A}R$ davant processos neuroinflamatoris per tal de caracteritzar amb més detall quin és el seu paper en la progressió o l'aturament d'una cascada inflamatòria.

1.7.2. El receptor d'adenosina A₃

L'existència del receptor d'adenosina A₃ va ser hipotetitzada fa gairebé 40 anys en un intent de caracteritzar el subtipus de receptor d'adenosina que es trobava involucrat en l'acció inhibidòria de l'adenosina a nivell neuromuscular en les granotes. Per tal d'explicar aquesta funció, havia d'existir un nou subtipus de receptor d'adenosina que encara no havia estat descrit³²⁰.

Estructuralment, el receptor d'adenosina A₃ presenta una gran diversitat entre les diferents espècies. De fet, l'homologia que presenten el receptor A₃ de rata i l'humà és només del 74%³²¹. Aquest subtipus de receptor d'adenosina, s'ha mapejat en el cromosoma humà 1p21-p13 i està format, concretament, per 318 residus aminoacídics³²². Aquest GPCR presenta una estructura de set dominis transmembrana i dos extrems N- i C-terminals. L'extrem C-terminal consta de múltiples residus de Ser i Thr que tenen un gran potencial a ser fosforilades i són de gran importància per a la dessensibilització del receptor un cop aquest ha estat activat i ha finalitzat la seva resposta³²³. Actualment, s'han dissenyat nombrosos agonistes pel receptor A₃ que provenen de múltiples modificacions en el nucleòsid d'adenosina. Aquestes modificacions estructurals són majoritàriament en les posicions N6, C2 i 5'. Per exemple, l'agonista IB-MECA deriva d'una combinació de modificacions de l'adenosina en les posicions 5' i N6, on s'ha afegit un grup metiluronamida i iodebenzil respectivament. De fet, la introducció de petits grups en la posició C2 de l'IB-MECA augmenta significativament l'afinitat i la selectivitat del compost pel receptor A₃, com és el cas de l'agonista 2-Cl-IB-MECA³²⁴. En darrer lloc, és important destacar que s'han sintetitzat altres agonistes selectius de l'A₃R mitjançant modificacions en l'anell de ribosa present en el nucleòsid de l'adenosina³²⁵.

En l'organisme humà, el receptor A₃ s'expressa en la majoria de teixits com, per exemple, els testicles, el pulmó, els ronyons, la placenta, el cor, el cervell, la melsa, el fetge, l'úter, la bufeta, el colon i els ulls³²⁶. No obstant, els nivells d'expressió són molt diferents entre teixits, amb uns nivells elevats en els pulmons o el fetge i considerablement baixos en el cervell o l'aorta. A nivell cel·lular, s'ha observat expressió d'A₃R en micròglia i astròcits, les cèl·lules immunitàries del teixit cerebral³²⁷. Contràriament, no existeix cap evidència d'una elevada expressió del receptor A₃ en cèl·lules com els cardiomiòcits^{328,329}, però sí nivells molt elevats d'expressió en les cèl·lules endotelials presents en les artèries coronàries i caròtides^{330,331}. És important tenir en compte que s'ha detectat l'expressió d'A₃R en cèl·lules primàries involucrades en la resposta inflamatòria, tals com els eosinòfils³³², els neutròfils³³³, els monòcits³³⁴, els macròfags³³⁵, les cèl·lules dendrítiques³³⁶, els limfòcits³³⁷ o les cèl·lules del moll de l'ós³³⁸. Finalment, s'han trobat nivells d'expressió d'A₃R molt elevats en diverses línies cel·lulars canceroses i teixits tumorals, fet que suggereix un rol important d'aquest receptor com a marcador tumoral^{339,340}.

El receptor A₃ d'adenosina s'acobla principalment a la proteïna G_i, i de manera més esporàdica, a la proteïna G_q³⁴¹. L'activació del receptor A₃ en cèl·lules CHO transfectades inhibeix l'acumulació d'AMPc per l'acoblament funcional a proteïna G_i, ja que aquesta inhibició desapareix en presència de la toxina *pertussis*³⁴².

A més, l'activació del receptor A_3 també incrementa l'activitat específica del fosfatidilinositol (PLC) i això desemboca en una mobilització de Ca^{2+} intracel·lular³⁴³⁻³⁴⁵. D'altra banda, la subunitat β/γ de la proteïna G també es capaç d'activar la via de les MAP quinases i la posterior fosforilació de les ERK1/2 quan es dissocia de la subunitat $G\alpha$ catalítica. Una altra via de senyalització rellevant durant l'activació d' A_3R és la PI3K/Akt, ja que l'activació del receptor A_3 promou la fosforilació de les Akt gràcies a l'acció de la subunitat β/γ de la proteïna G a la qual s'acobla³⁴⁶. És important destacar que les principals accions antiinflamatòries del receptor A_3 es produeixen mitjançant les vies de senyalització PI3K/Akt i CREB/NF- κB , ja que en cèl·lules microgials tractades amb LPS, l'activació del receptor A_3 és capaç de suprimir la producció de TNF- α i IL-2 gràcies a l'activació de les vies PI3K/Akt i CREB/NF- κB ³⁴⁷. En conjunt, l'activació del receptor A_3 pot desencadenar en la mobilització de diferents missatgers secundaris i vies de senyalització. En aquest sentit, és important caracteritzar aquesta senyalització tant complexa per tal d'entendre els mecanismes cel·lulars que es produeixen tant en condicions fisiològiques com en condicions patològiques.

En el Sistema Nerviós Central, el rol del receptor A_3 genera certa controvèrsia. Per exemple, està descrit que la seva activació té un efecte neuroprotector en els primers estadis d'una isquèmia cerebral, mentre que s'ha vist com una activació perllongada en el temps d'aquest receptor pot tenir efectes molt nocius en el desenvolupament de la mateixa patologia, ja que s'incrementarien els efectes excitotòxics³⁴⁸. Paral·lelament, s'ha descrit una sobreexpressió del receptor A_3 en el SNC de pacients que pateixen la malaltia d'Alzheimer, mentre que no s'han vist canvis a nivell d'expressió en pacients amb la malaltia de Parkinson³⁴⁹. En cèl·lules gials activades, s'ha observat un efecte antiinflamatori de l' A_3R , essent capaç de reduir la migració cel·lular i la producció de TNF- α ³⁵⁰. Aquests efectes neuroprotectors del receptor A_3 també s'han observat en astròcits ja que s'ha vist que són capaços de produir la quimiocina CCL2, capaç de reduir la migració cel·lular, quan s'activa el receptor A_3 ³⁵¹. És important destacar que s'ha detectat una sobreexpressió d' A_3R en moltes malalties autoimmunitàries, que pot ser atribuït a l'augment de la concentració extracel·lular d'adenosina davant d'aquestes condicions patològiques. Factors de transcripció com el CREB i el NF- κB s'encarreguen de promoure una resposta inflamatòria i es troben inversament associats a la sobreexpressió del receptor A_3 ³⁵². Les dades publicades fins a dia d'avui suggereixen que l'activació d' A_3R desemboca en efectes antiinflamatoris i que els agonistes d'aquest receptor són molècules amb un elevat poder terapèutic per tractar i pal·liar diversos desordres neurològics que cursen amb inflamació. Terapèuticament, la modulació al·lostèrica del receptor A_3 s'està valorant com una opció molt factible per a la medicina moderna a l'hora de tractar nombroses patologies, ja que l'expressió tant generalitzada d'aquest receptor fa que una modulació ortostèrica pugui tenir molts efectes indesitjats³⁵³.

Resumint, la investigació del receptor A_3 i dels seus lligands específics es troba en constant creixement i presenta un gran impacte en el descobriment de noves estratègies terapèutiques ja que aquest receptor està involucrat en nombrosos processos fisiològics i patològics. Un enteniment detallat d' A_3R proporciona una base sòlida per al desenvolupament futur de diferents estratègies farmacològiques.

Per tant, la investigació científica cada cop està més a prop del seu objectiu de transformar els lligands d'adenosina en fàrmacs capaços de millorar la salut humana.

1.7.3. L'heteromerització dels receptors d'adenosina

En els darrers vint anys s'han acumulat clares evidències que demostren la capacitat dels receptors d'adenosina de formar complexos oligomèrics³⁵⁴. Entre els diferents complexos descrits, és important destacar l'heteròmer format pels receptors d'adenosina A_1 i A_{2A} . Inicialment, resulta complicat entendre el rol fisiològic d'un complex heteromèric on un receptor, en aquest cas l' A_1R , s'acobla a proteïna G_i , mentre que l'altre, el receptor A_{2A} , s'acobla a proteïna G_s ⁷¹. Aquests dos receptors presenten senyalitzacions antagòniques, però quan es troben interaccionant, es forma un complex heteromèric que actua com a sensor de la concentració d'adenosina present en l'espai extracel·lular. Aquests receptors formen un heterotetràmer constituït per un homodímer de receptors A_1 , un homodímer de receptors A_{2A} i dues proteïnes G, una G_i i una G_s ^{355,356}. Quan la concentració d'adenosina extracel·lular és baixa, predominarà la senyalització A_1R-G_i , ja que presenta una afinitat més elevada pel nucleòsid, mentre que, quan la concentració d'adenosina augmenta, es produirà la senyalització $A_{2A}R-G_s$, que té una menor afinitat pel seu lligand endogen i bloquejarà al receptor A_1 en ser activat (Figura 16)³⁵⁴.

L'heteròmer format pels receptors d'adenosina A_{2A} i A_{2B} també es troba àmpliament descrit. En aquest cas, ambdós receptors acoblen una proteïna G_s i la senyalització predominant és la del receptor A_{2A} ^{357,358}. De manera interessant, quan l'expressió del receptor A_{2B} augmenta, la senyalització del receptor A_{2A} es veu bloquejada. Per tant, l'heteròmer $A_{2A}R-A_{2B}R$ es comporta com una gran unitat funcional que, davant de certs processos patològics com la hipòxia, l'expressió del receptor A_{2B} augmenta considerablement i d'aquesta manera es pot bloquejar el caràcter pro-inflamatori i nociu que presenta el receptor A_{2A} en ser activat (Figura 16)^{359,360}.

Per últim, l'heteròmer format pels receptors d'adenosina A_{2A} i A_3 s'ha identificat i caracteritzat durant el desenvolupament d'aquesta Tesi Doctoral. Si tenim en compte tota aquesta informació, podem hipotetitzar que els quatre subtipus de receptors d'adenosina són capaços d'interaccionar entre ells. No obstant, no hi ha informació corresponent als heteròmers dels receptors $A_{2B}-A_3$ i A_1-A_3 i el trencaclosques de la senyalització adenosinèrgica no es trobarà complert fins que es caracteritzin aquestes interaccions³⁶¹.

Finalment, és important tenir en compte que els receptors d'adenosina també són capaços d'interaccionar amb molts altres GPCR de diferents famílies, com seria el cas dels heteròmers formats pels receptors $A_{2A}-D_2$ i $A_{2A}-CB_2$, on es produeix un bloqueig per part del receptor A_{2A} i es potencia la funció dopaminèrgica i canabinoide en presència d'un antagonista del receptor A_{2A} tant en cèl·lules HEK-293T transfectades com en cultius primaris de micròglia provinent de ratolins *wild-type* i ratolins $APP_{Sw,Ind}$ com a model animal de la malaltia d'Alzheimer^{178,362}.

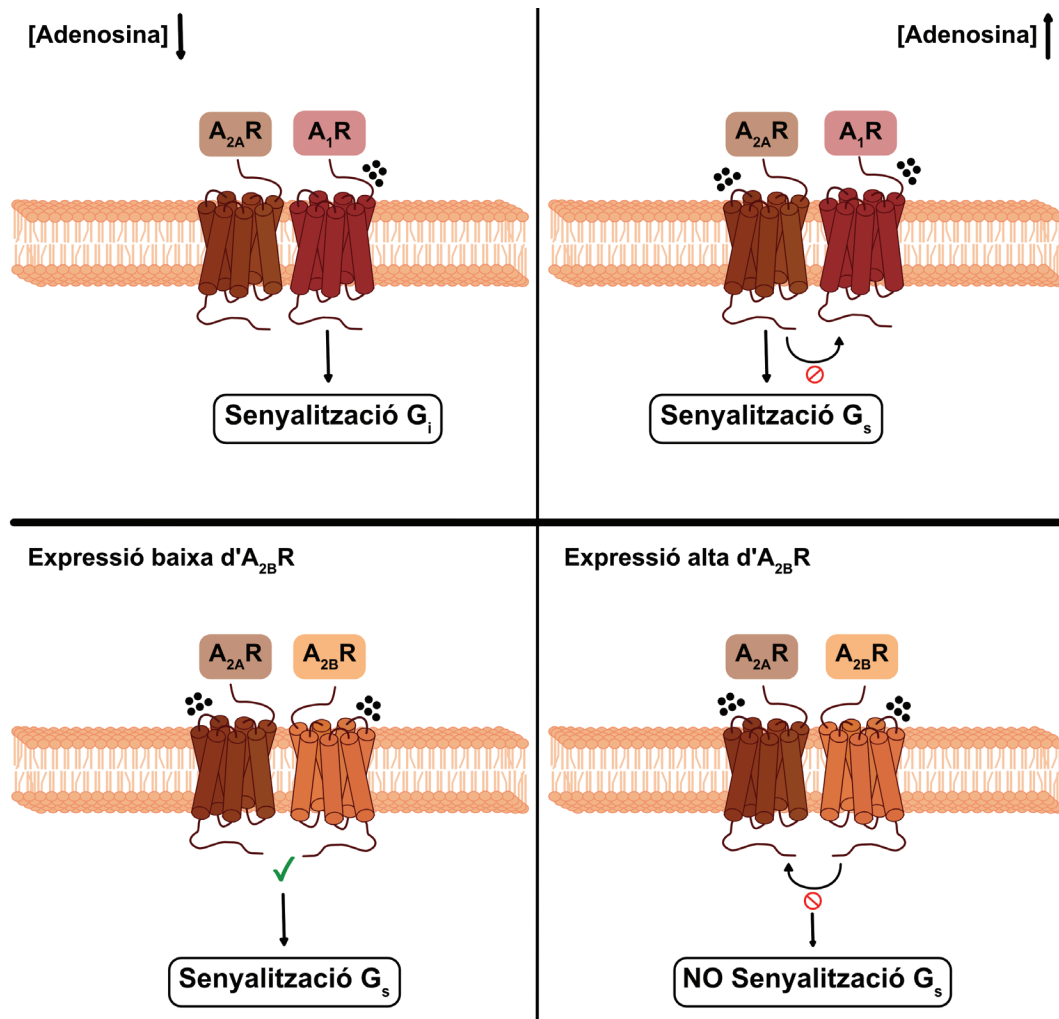


Figura 16: Implicació funcional de la formació d'heterodímers entre receptors d'adenosina.

1.7.4. Els receptors d'adenosina en la malaltia d'Alzheimer

Primerament, és important tenir en compte que l'adenosina presenta dos efectes moduladors a nivell de SNC, ja que per un costat actua com a modulador homeostàtic i per l'altre com a neuromodulador a nivell sinàptic. Els seus efectes són mediatos pels receptors d'adenosina, que formen part de la família dels GPCRs, essent els subtipus A_1R i $A_{2A}R$ els receptors d'alta afinitat i els més estudiats. Està àmpliament descrit que l'activació del receptor d'adenosina A_{2A} promou el progrés de la neurodegeneració, mentre que els receptors A_1 i A_3 presenten un efecte més protector. Si entrem en més detall, s'ha descrit que la transducció de senyal del receptor A_{2A} és capaç de modular i afavorir el desenvolupament de diverses malalties neuroinflamatòries com l'Alzheimer^{200,275,294}. D'acord amb aquests estudis, l'ús d'antagonistes d'aquest receptor confereix neuroprotecció en diferents condicions patològiques del nostre cervell. Un exemple clar recau en una millora dels dèficits cognitius en ratolins $APP_{Sw,Ind}$ com a model animal de la malaltia d'Alzheimer^{363,364}.

L'efecte neuroprotector del bloqueig del receptor A_{2A} pot ser mimetitzat perfectament per la cafeïna^{275,365}, ja que s'ha descrit en nombrosos estudis que el consum d'aquesta substància, un antagonista no-selectiu dels receptors d'adenosina, és inversament proporcional a la incidència de la malaltia d'Alzheimer i d'altres tipus de demències^{319,366}. En la mateixa línia, altres estudis han demostrat clarament que, en models animals de ratolins als quals s'ha administrat una injecció intracerebroventricular de pèptid A β , tant la cafeïna com l'antagonista específic del receptor A_{2A} , l'SCH58261, són capaços de reduir la sinaptotoxicitat i millorar el dèficit cognitiu³⁶⁷. En conjunt, aquests estudis arriben a la conclusió de que, el bloqueig del receptor d'adenosina A_{2A} mitjançant antagonistes, és capaç de millorar la simptomatologia de la malaltia d'Alzheimer, reduint la pèrdua de memòria, la disfunció sinàptica i els dèficits cognitius³⁶⁴. A més, fent ús de la tècnica PET (tomografia d'emissió de positrons), s'ha descrit que existeix una sobreexpressió del receptor A_{2A} en neurones hipocàmpals i de l'escorça frontal d'individus que pateixen la malaltia d'Alzheimer^{368,369}. Contràriament, pel que fa al receptor d'adenosina A_1 , s'ha demostrat que els seus nivells d'expressió són més baixos en l'hipocamp d'individus amb la malaltia d'Alzheimer si els comparem amb individus sans³⁷⁰ mentre que existeix una sobreexpressió del receptor A_1 en l'escorça frontal i en les neurones apoptòtiques d'individus amb Alzheimer^{368,371}.

Paral·lelament, s'ha vist que l'activació del receptor d'adenosina A_{2A} en les cèl·lules endotelials fa incrementar la permeabilitat de la barrera hematoencefàlica, fet que facilita l'entrada de macromolècules tals com factors proinflamatoris i neurotòxics al SNC, contribuint fortament en la progressió de la malaltia d'Alzheimer³⁷². A més, en cervells de pacients amb Alzheimer, s'ha detectat una sobreexpressió del receptor A_{2A} en astròcits, que es tradueix en una reducció de la capacitat d'absorció de glutamat per part de la cèl·lula, desencadenant en una important excitotoxicitat³⁷³. Per últim, és molt important destacar que els receptors d'adenosina i, concretament el receptor d'adenosina A_{2A} , poden ser dianes terapèutiques essencials per a poder aturar la progressió d'una malaltia tant àmpliament distribuïda en la nostra societat com és la malaltia d'Alzheimer³⁷⁴.

1.7.5. Els receptors d'adenosina en l'Esclerosi Múltiple

Estudis recents han determinat que els pacients amb Esclerosi Múltiple expressen nivells alterats d'adenosina, dels seus receptors i d'altres proteïnes involucrades en la cascada de senyalització d'aquest nucleòsid³⁷⁵.

El receptor d'adenosina A_{2A} presenta un rol molt important en el desenvolupament de l'Esclerosi Múltiple. De fet, ratolins *knockout* per al receptor A_{2A} que pateixen encefalomièlitis (EAE), un model animal d'Esclerosi Múltiple àmpliament acceptat, presenten una progressió de la malaltia molt més severa en comparació amb els ratolins *wild-type*³⁷⁶, fet que s'atribueix a un augment en el nombre de cèl·lules que secreten factors pro-inflamatoris com l'IFN- γ , la IL-17 i el GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)³⁷⁷. Concretament, els ratolins *knockout* pel receptor A_{2A} presentaven un augment en el dany axonal, una desmielinització més extensa i un augment en el nombre de cèl·lules T auto-reactives a nivell de SNC³⁷⁸.

A més a més, s'ha observat que el receptor A_{2A} es troba sobreexpressat en l'endoteli de les àrees del cervell on trobem lesions provocades pel desenvolupament d'aquesta malaltia autoimmunitària i, els limfòcits provinents de pacients amb Esclerosi Múltiple, presenten una expressió del receptor A_{2A} superior si ho comparem amb els limfòcits T d'individus sans. A més, el tractament dels limfòcits T auto-reactius amb agonistes específics del receptor A_{2A} , desemboca en una inhibició de la secreció de compostos pro-inflamatoris tals com la IL-6, la IL-17, l'IFN- γ , el VLA-4 i el NF- $\kappa\beta$ ³⁷⁹. Paradoxalment, resultats similars s'han obtingut amb el tractament amb antagonistes específics del receptor A_{2A} , ja que s'ha observat com, l'administració d'antagonistes d'aquest receptor en els estadis més severos de la malaltia, produeix una disminució en la infiltració de cèl·lules T al SNC, en els nivells d'IFN- γ i en la progressió de la desmielinització.

Està generalment acceptat que l'estimulació del receptor A_{2A} es troba associada amb la inhibició de la diferenciació de les cèl·lules progenitores d'oligodendròcits i amb l'augment de la permeabilització de la barrera hematoencefàlica³⁷². De fet, s'ha descrit que l'activació del receptor A_{2A} afavoreix l'expressió de la quimiocina CX3CL1 en les cèl·lules presents en la barrera hematoencefàlica, fet que permetrà la infiltració massiva de cèl·lules T auto-reactives en el SNC³⁸⁰. En paral·lel, estudis recents demostren que la inhibició del receptor A_{2A} redueix la permeabilitat de la barrera hematoencefàlica i, conseqüentment, s'atenua la infiltració de limfòcits T al SNC i la progressió de la malaltia³⁸¹. Aquest conjunt de resultats que ha generat certa controvèrsia en la investigació de l'Esclerosi Múltiple, es podria resumir destacant la dualitat del receptor A_{2A} ja que, en els estadis primerencs del desenvolupament de la malaltia, reduirà la severitat de la patologia mentre que, en els estadis més severos, afavorirà la progressió d'aquesta³⁷⁷.

Finalment, és important destacar que el receptor d'adenosina A_3 presenta un paper molt important en la regulació immunitària³⁷⁵. Precisament, un estudi recent demostra que el receptor A_3 es troba sobreexpressat en el SNC de ratolins amb encefalomièlitis i que la seva activació amb agonistes específics com el 2-Cl-IB-MECA redueix la secreció de TNF- α per part de les cèl·lules microgials d'aquests ratolins³⁸². No obstant, mentre el paper del receptor A_3 ha estat àmpliament caracteritzat en la investigació contra el càncer³⁸³, el seu rol en la fisiopatologia de l'Esclerosi Múltiple encara no ha estat estudiat i la informació sobre aquest receptor és limitada. Per tant, són necessaris més estudis per tal de determinar el paper del receptor A_3 en la progressió de l'Esclerosi Múltiple i poder contribuir així en el disseny de noves estratègies terapèutiques on la senyalització adenosinèrgica obre un ampli ventall de possibilitats per a un enteniment més profund d'aquesta patologia³⁷⁵.

A large flock of birds, depicted as black silhouettes, is arranged in a circular pattern around the word "OBJECTIUS". The birds are flying in a clockwise direction, creating a sense of movement and focus on the central text. The word "OBJECTIUS" is written in a bold, black, sans-serif font, centered within the circle of birds. The background is a light, neutral color, which makes the dark silhouettes and text stand out prominently.

OBJECTIUS

2. OBJECTIUS

- **Objectiu 1:** Determinar si els receptors de cannabinoides de tipus 1 (CB₁R) i de tipus 2 (CB₂R) formen complexos heteromèrics amb el receptor de grelina (GHS-R1a) a nivell de membrana plasmàtica i caracteritzar la seva expressió i senyalització en cultius primaris de neurones estriatals provinents de ratolins alimentats amb una dieta hipercalòrica.
- **Objectiu 2:** Caracteritzar la selectivitat funcional d'una llibreria de compostos cannabinoides pels receptors CB₁, CB₂ i l'heteròmer de receptors CB₁-CB₂ en absència i presència de CBD.
- **Objectiu 3:** Caracteritzar l'agonisme esbiaixat de les formes àcides i varíniques del cannabidiol (CBDA i CBDV), del cannabigerol (CBGA i CBGV) i del Δ⁹-THC (Δ⁹-THCA i Δ⁹-THCV) pels receptors cannabinoides CB₁, CB₂ i l'heteròmer de receptors CB₁-CB₂.
- **Objectiu 4:** Determinar si existeix una interacció específica entre els receptors d'adenosina A_{2A} i A₃ a nivell de membrana plasmàtica i caracteritzar l'expressió i senyalització del nou complex heteromèric en neurones primàries d'escorça, d'estriat i d'hipocamp i en cultius primaris microglials de ratolins CD-1 i ratolins APP_{Sw,Ind} model animal d'Alzheimer. Finalment, detectar el nivell d'expressió de l'heteròmer de receptors A_{2A}-A₃ en seccions de cervell provinents de ratolins model d'Esclerosi Múltiple.
- **Objectiu 5:** Determinar si existeix una interacció específica entre el receptor d'adenosina A_{2A} i el receptor de cannabinoides CB₂ a nivell de membrana plasmàtica i caracteritzar la senyalització del nou complex en cultius primaris de micròglia en repòs i micròglia activada. Detectar els canvis en l'expressió i senyalització de l'heteròmer A_{2A}R-CB₂R en cultius primaris de micròglia provinents de ratolins APP_{Sw,Ind} model animal d'Alzheimer.

A large graphic of a flock of birds flying in a circular path around the word "RESULTATS". The birds are arranged in a wide, shallow arc that curves around the text. The birds are depicted in various shades of gray and black, with some appearing as solid black silhouettes and others as lighter gray shapes. The overall effect is a sense of movement and a large-scale assembly.

RESULTATS

Gemma Navarro Brugal i Rafael Franco Fernández
Grup de Neurofarmacologia Molecular
Departament de Bioquímica i Fisiologia
Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona
Avinguda de Joan XXIII, 27-31, 08028, Barcelona

La Tesi Doctoral de l'Alejandro Lillo Márquez que reb el títol de "**Potencial dels heteròmers de receptors d'adenosina i de cannabinoides com a dianes terapèutiques en malalties neurodegeneratives i obesitat**" es presenta com un compendi de publicacions.

L'article "**Ghrelin and cannabinoid functional interactions mediated by ghrelin/CB₁ receptor heteromers that are upregulated in the striatum from offspring of mice under a high fat diet**" ha estat publicat a la revista *Frontiers in Cellular Neuroscience* amb un factor d'impacte en l'any de publicació (2021) de 6,147 (Q1). L'article "**Identification of the ghrelin and cannabinoid CB₂ receptor heteromer functionality and marked upregulation in striatal neurons from offspring of mice under a high-fat diet**" ha estat publicat a la revista *International Journal of Molecular Sciences* amb un factor d'impacte en l'any de publicació (2021) de 6,208 (Q1). L'article "**Cannabidiol skews biased agonism at cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors with smaller effect in CB₁-CB₂ heteroreceptor complexes**" ha estat publicat a la revista *Biochemical Pharmacology* amb un factor d'impacte en l'any de publicació (2018) de 4,825 (Q1). L'article "**Pharmacological data of cannabidiol- and cannabigerol-type phytocannabinoids acting on cannabinoid CB₁, CB₂ and CB₁/CB₂ heteromer receptors**" ha estat publicat a la revista *Pharmacological Research* amb un factor d'impacte en l'any de publicació (2020) de 7,658 (Q1). L'article "**Similarities and differences upon binding of naturally occurring Δ⁹-tetrahydrocannabinol-derivatives to cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors**" ha estat publicat a la revista *Pharmacological Research* amb un factor d'impacte en l'any de publicació (2021) de 10,334 (Q1). L'article "**Adenosine A_{2A} and A₃ receptors are able to interact with each other. A further piece in the puzzle of adenosine receptor-mediated signaling**" ha estat publicat a la revista *International Journal of Molecular Sciences* amb un factor d'impacte en l'any de publicació (2020) de 5,924 (Q1). L'article "**Expression of the adenosine A_{2A}-A₃ receptor heteromer in different brain regions and marked upregulation in the microglia of the transgenic APP_{Sw,Ind} Alzheimer's disease model**" ha estat publicat a la revista *Biomedicines* amb un factor d'impacte en l'any de publicació (2022) de 4,757 (Q2). L'article "**Potentiation of cannabinoid signaling in microglia by adenosine A_{2A} receptor antagonists**" ha estat publicat a la revista *Glia* amb un factor d'impacte en l'any de publicació (2019) de 5,984 (Q1).

En l'estudi "**Ghrelin and cannabinoid functional interactions mediated by ghrelin/CB₁ receptor heteromers that are upregulated in the striatum from offspring of mice under a high fat diet**" el doctorand Alejandro Lillo va participar en la realització dels assajos d'immunocitoquímica, els assajos de transferència d'energia ressonant per bioluminescència (BRET), els assajos de senyalització d'acumulació d'AMPC intracel·lular, fosforilació de les ERK1/2 i mobilització de Ca²⁺ en cèl·lules HEK-293T transfectades i va participar en la redacció del manuscrit i en el disseny i obtenció de les figures on s'inclouen les representacions gràfiques. En l'estudi "**Identification of the**

ghrelin and cannabinoid CB₂ receptor heteromer functionality and marked upregulation in striatal neurons from offspring of mice under a high-fat diet" el doctorand Alejandro Lillo va participar en la preparació dels cultius primaris de neurones d'estriat a partir de fetus de ratolins CD-1 així com en la realització dels assajos de senyalització en neurones estriatals i, per últim, va participar en la redacció del manuscrit i en el disseny i obtenció de les figures on s'inclouen les representacions gràfiques. En l'estudi **"Cannabidiol skews biased agonism at cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors with smaller effect in CB₁-CB₂ heteroreceptor complexes"** el doctorand Alejandro Lillo va realitzar els assajos d'acumulació d'AMPC intracel·lular, de fosforilació de les ERK1/2 i de reclutament de β-arrestines en cèl·lules HEK-293T transfectades. En els estudis **"Pharmacological data of cannabidiol- and cannabigerol-type phytocannabinoids acting on cannabinoid CB₁, CB₂ and CB₁/CB₂ heteromer receptors"** i **"Similarities and differences upon binding of naturally occurring Δ⁹-tetrahydrocannabinol-derivatives to cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors"** el doctorand Alejandro Lillo va participar en la realització dels assajos de *binding* per HTRF, els assajos d'acumulació d'AMPC intracel·lular i fosforilació de les ERK1/2 en cèl·lules HEK-293T transfectades així com en el disseny i obtenció de les figures on s'inclouen les representacions gràfiques. En l'estudi **"Adenosine A_{2A} and A₃ receptors are able to interact with each other. A further piece in the puzzle of adenosine receptor-mediated signaling"** el doctorand Alejandro Lillo va participar en la realització dels assajos d'immunocitoquímica, els assajos de transferència d'energia ressonant per bioluminescència (BRET), els assajos de *binding* per HTRF, els assajos de senyalització d'acumulació d'AMPC intracel·lular, fosforilació de les ERK1/2 i reclutament de β-arrestines així com en la preparació de cultius primaris de neurones corticals provinents de fetus de ratolins CD-1 i, per últim, també va participar en la redacció del manuscrit i en el disseny i obtenció de les figures que contenen les representacions gràfiques. En l'estudi **"Expression of the adenosine A_{2A}-A₃ receptor heteromer in different brain regions and marked upregulation in the microglia of the transgenic APP_{Sw,Ind} Alzheimer's disease model"** el doctorand Alejandro Lillo va participar en la preparació de cultius primaris neuronals i microgials, en la realització dels assajos d'acumulació d'AMPC intracel·lular i de lligació per proximitat (PLA) així com en la redacció del manuscrit i en la preparació de les figures que contenen les representacions gràfiques. Per últim, en l'estudi **"Potentiation of cannabinoid signaling in microglia by adenosine A_{2A} receptor antagonists"** el doctorand Alejandro Lillo va participar en la preparació dels cultius primaris de micròglia provinents de *pups* de 2-4 dies de ratolins CD-1 així com en la realització i quantificació dels assajos d'immunocitoquímica.

Barcelona, Febrer de 2023

NAVARRO
BRUGAL
GEMMA -
46784268Z

Firmado digitalmente por NAVARRO BRUGAL GEMMA - 46784268Z Fecha: 2023.02.24 11:42:34 +01'00'

Dra. Gemma Navarro Brugal
Directora i tutora

FRANCO
FERNANDEZ
Z RAFAEL -
37678082B

Firmado digitalmente por FRANCO FERNANDEZ RAFAEL - 37678082B Fecha: 2023.02.24 10:50:17 +01'00'

Dr. Rafael Franco Fernández
Director

Els resultats de la present Tesi Doctoral estan reflexos en els següents articles científics:

- **Ghrelin and cannabinoid functional interactions mediated by ghrelin/CB₁ receptor heteromers that are upregulated in the striatum from offspring of mice under a high fat diet:** *Alejandro Lillo**, *Jaume Lillo**, *Iu Raïch*, *Cristina Miralpeix*, *Francesc Dosrius*, *Gemma Navarro[#]*, *Rafael Franco[#]*.

Frontiers in Cellular Neuroscience. 2021 Dec 9. doi: 10.3389/fncel.2021.786597. IF = 6,147 (Q1).

- **Identification of the ghrelin and cannabinoid CB₂ receptor heteromer functionality and marked upregulation in striatal neurons from offspring of mice under a high-fat diet:** *Jaume Lillo**, *Alejandro Lillo**, *David A. Zafra*, *Cristina Miralpeix*, *Rafael Rivas-Santisteban*, *Núria Casals*, *Gemma Navarro*, *Rafael Franco*.

International Journal of Molecular Science. 2021 Aug 19. doi:10.3390/ijms22168928. IF = 6,208 (Q1).

- **Cannabidiol skews biased agonism at cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors with smaller effect in CB₁-CB₂ heteroreceptor complexes:** *Gemma Navarro*, *Irene Reyes-Resina*, *Rafael Rivas-Santisteban*, *Verónica Sánchez de Medina*, *Paula Morales*, *Salvatore Casano*, *Carlos Ferreiro-Vera*, *Alejandro Lillo*, *David Aguinaga*, *Nadine Jagerovic*, *Xavier Nadal*, *Rafael Franco*.

Biochemical Pharmacology. 2018 Sep 5. doi: 10.1016/j.bcp.2018.08.046. IF = 4,825 (Q1).

- **Pharmacological data of cannabidiol- and cannabigerol-type phytocannabinoids acting on cannabinoid CB₁, CB₂ and CB₁/CB₂ heteromer receptors:** *Gemma Navarro*, *Katia Varani*, *Alejandro Lillo*, *Fabrizio Vincenzi*, *Rafael Rivas-Santisteban*, *Iu Raïch*, *Irene Reyes-Resina*, *Carlos Ferreiro-Vera*, *Pier Andrea Borea*, *Verónica Sánchez de Medina*, *Xavier Nadal*, *Rafael Franco*.

Pharmacological Research, 2020 May 26. doi: 10.1016/j.phrs.2020.104940. IF = 7,658 (Q1).

- **Similarities and differences upon binding of naturally occurring Δ⁹-tetrahydrocannabinol-derivatives to cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors:** *Iu Raïch*, *Rafael Rivas-Santisteban*, *Alejandro Lillo*, *Jaume Lillo*, *Irene Reyes-Resina*, *Xavier Nadal*, *Carlos Ferreiro-Vera*, *Verónica Sánchez de Medina*, *Maria Majellaro*, *Eddy Sotelo*, *Gemma Navarro*, *Rafael Franco*.

Pharmacological Research 2021 Nov 7. doi: 10.1016/j.phrs.2021.105970. IF = 10,334 (Q1).

- **Adenosine A_{2A} and A₃ receptors are able to interact with each other. A further piece in the puzzle of adenosine receptor-mediated signaling:** *Alejandro Lillo*, *Eva Martínez-Pinilla*, *Irene Reyes-Resina*, *Gemma Navarro*, *Rafael Franco*.

International Journal of Molecular Science. 2020 Jul 17. doi:10.3390/ijms21145070. IF = 5,924 (Q1).

- **Expression of the adenosine A_{2A}-A₃ receptor heteromer in different brain regions and marked upregulation in the microglia of the transgenic APP_{Sw,Ind} Alzheimer's disease model:** *Alejandro Lillo, Iu Raïch, Jaume Lillo, Catalina Perez-Olives, Gemma Navarro, Rafael Franco.*

Biomedicines. 2022 Jan 19. doi: 10.3390/biomedicines10020214. IF = 4,757 (Q2).

- **Potentialiation of cannabinoid signaling in microglia by adenosine A_{2A} receptor antagonists:** *Rafael Franco, Irene Reyes-Resina, David Aguinaga, Alejandro Lillo, Jasmina Jiménez, Iu Raïch, Dasiel O Borroto-Escuela, Carlos Ferreiro-Vera, Enric I Canela, Verónica Sánchez de Medina, Anna Del Ser-Badía, Kjell Fuxe, Carlos A Saura, Gemma Navarro.*

Glia. 2019 Jul 22. doi: 10.1002/glia.23694. IF = 5,984 (Q1).

3.1. Ghrelin and cannabinoid functional interactions mediated by ghrelin/CB₁ receptor heteromers that are upregulated in the striatum from offspring of mice under a high-fat diet.

Alejandro Lillo*, Jaume Lillo*, Iu Raïch, Cristina Miralpeix, Francesc Dosrius, Rafael Franco[#] i Gemma Navarro[#].

Article publicat a la revista *Frontiers in Cellular Neuroscience*, Desembre 2021. doi: 10.3389/fncel.2021.786597.

Existeix una clara evidència d'una interacció fisiològica entre el sistema cannabinoide i de la grelina en el nostre Sistema Nerviós Central (SNC) que afecta directament a la plasticitat neuronal dels circuits de recompensa. L'objectiu principal d'aquest estudi va consistir en determinar les interaccions moleculars i funcionals entre el receptor cannabinoide de tipus 1 (CB₁R) i el receptor de grelina (GHS-R1a). En un sistema heteròleg com són les cèl·lules HEK-293T transfectades i fent ús de la tècnica de transferència d'energia ressonant per bioluminescència (BRET), es va demostrar que el receptor CB₁ i el receptor GHS-R1a són capaços d'interaccionar formant complexos heteromèrics. A més, es va determinar que la senyalització característica del nou heteròmer descrit es basa en un bloqueig de la senyalització G_i del receptor CB₁ per part del receptor GHS-R1a i, alhora, en una potenciació de la senyalització G_q del receptor GHS-R1a per part del receptor CB₁, sobretot quan el receptor cannabinoide s'activa a baixes concentracions de l'agonista específic ACEA. Mitjançant l'assaig de lligació per proximitat (PLA), es va demostrar l'expressió d'heteròmers CB₁R-GHS-R1a en cultius primaris de neurones estriatals de ratolins CD-1. A més, es va determinar una sobreexpressió d'aquests complexos heteromèrics en presència de 200 nM de grelina i 100 nM d'ACEA. Paral·lelament, la sobreexpressió de l'heteròmer CB₁R-GHS-R1a també s'observà en cultius primaris de neurones estriatals provinents de ratolins alimentats amb dieta hipercalòrica (HFD) en comparació amb ratolins alimentats amb dieta estàndard (STD). Tots aquests resultats ens ajuden a entendre millor la gran complexitat de les interaccions funcionals neuromoduladores presents en el nostre Sistema Nerviós Central.



Ghrelin and Cannabinoid Functional Interactions Mediated by Ghrelin/CB₁ Receptor Heteromers That Are Upregulated in the Striatum From Offspring of Mice Under a High-Fat Diet

OPEN ACCESS

Edited by:

Yamina Berchiche,
Dr. GPCR, United States

Reviewed by:

Serge N. Schiffmann,
Université libre de Bruxelles, Belgium
Roberto Coccarello,
National Research Council (CNR),
Italy

*Correspondence:

Rafael Franco
rfranco123@gmail.com
Gemma Navarro
dimartts@hotmail.com

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Cellular Neurophysiology,
a section of the journal
Frontiers in Cellular Neuroscience

Received: 30 September 2021

Accepted: 08 November 2021

Published: 09 December 2021

Citation:

Lillo A, Lillo J, Raïch I, Miralpeix C,
Dosrius F, Franco R and Navarro G
(2021) Ghrelin and Cannabinoid
Functional Interactions Mediated by
Ghrelin/CB₁ Receptor Heteromers
That Are Upregulated in the Striatum
From Offspring of Mice Under a
High-Fat Diet.
Front. Cell. Neurosci. 15:786597.
doi: 10.3389/fncel.2021.786597

**Alejandro Lillo^{1†}, Jaume Lillo^{2,3†}, Iu Raïch¹, Cristina Miralpeix^{4,5}, Francesc Dosrius³,
Rafael Franco^{2,3,6*†} and Gemma Navarro^{1,2,7*†}**

¹Department of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Science, University of Barcelona, Barcelona, Spain, ²Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Neurodegenerativas (CiberNed), National Institute of Health Carlos III, Madrid, Spain, ³Department of Biochemistry and Molecular Biomedicine, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, ⁴Basic Sciences Department, Faculty of Medicine and Health Sciences, Universitat Internacional de Catalunya, Sant Cugat del Vallès, Spain, ⁵University of Bordeaux, INSERM, Neurocentre Magendie, Bordeaux, France, ⁶School of Chemistry, University of Barcelona, Barcelona, Spain, ⁷Institut de Neurociències, Universitat de Barcelona (UBNeuro), Barcelona, Spain

There is evidence of ghrelinergic-cannabinoidergic interactions in the central nervous system (CNS) that may impact on the plasticity of reward circuits. The aim of this article was to look for molecular and/or functional interactions between cannabinoid CB₁ and ghrelin GHS-R1a receptors. In a heterologous system and using the bioluminescence resonance energy transfer technique we show that human versions of cannabinoid CB₁ and ghrelin GHS-R1a receptors may form macromolecular complexes. Such receptor heteromers have particular properties in terms of CB₁/G_i-mediated signaling and in terms of GHS-R1a-G_q-mediated signaling. On the one hand, just co-expression of CB₁R and GHS-R1a led to impairment of cannabinoid signaling. On the other hand, cannabinoids led to an increase in ghrelin-derived calcium mobilization that was stronger at low concentrations of the CB₁ receptor agonist, arachidonyl-2'-chloroethylamide (ACEA). The expression of CB₁-GHS-R1a receptor complexes in striatal neurons was confirmed by *in situ* proximity ligation imaging assays. Upregulation of CB₁-GHS-R1a- receptor complexes was found in striatal neurons from siblings of pregnant female mice on a high-fat diet. Surprisingly, the expression was upregulated after treatment of neurons with ghrelin (200 nM) or with ACEA (100 nM). These results help to better understand the complexities underlying the functional interactions of neuromodulators in the reward areas of the brain.

Keywords: CB₁ cannabinoid receptor, hunger hormone, marijuana consumption, orexigenic, obesity, addiction, ghrelin receptor (GHS-R1a), cannabinoids

INTRODUCTION

Cell surface cannabinoid receptors were identified as targets of natural compounds present in *Cannabis sativa*, specially of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC; (6aR, 10aR)-6,6,9-trimethyl-3-pentyl-6a,7,8,10a-tetrahydro-6H-benzo[c]chromen-1-ol; CAS registry number: #1972-08-3). So far, two cannabinoid receptors have been cloned and pharmacologically characterized, the CB₁ and the CB₂ receptors. They belong to class A rhodopsin-like G-protein coupled receptors (GPCRs) and both have Gi as the canonical heterotrimeric G protein to which they couple (Alexander et al., 2021). Subsequent to the discovery of cannabinoid receptors, the main compounds that act as endogenous agonists were identified, 2-arachidonoylglycerol (2-AG) and anandamide (N-arachidonylethanolamine). Further components of the endocannabinoid system are the enzymes that synthesize and degrade 2-AG and anandamide (Lu and Mackie, 2016). Cannabis smoking leads to psychotropic events that are due to Δ^9 -THC acting on the CB₁ receptor (CB₁R), which is reportedly the most abundant GPCR in the central nervous system, being expressed in almost any region of the brain and both in neurons and glia (Elphick and Egertová, 2001; Mackie, 2005). In addition, it is well established that cannabis use has orexigenic properties (Pagotto et al., 2006).

Ghrelin has been considered as the “hunger hormone” (Funahashi et al., 2003; Abizaid and Horvath, 2008; Schellekens et al., 2010; Cassidy and Tong, 2017). Ghrelin, a 28-amino acid peptide produced by specialized cells of the gastrointestinal tract, activates central mechanisms that control food intake (Funahashi et al., 2003; Abizaid and Horvath, 2008; Schellekens et al., 2010; Cassidy and Tong, 2017). However, in mammals, there are overlapping mechanisms, both central and peripheral, that control food intake. Ghrelin acts *via* a specific receptor, GHS-R1a, that belongs to the family of GPCRs, couples to G_q heterotrimeric G protein and is expressed in a variety of cells and tissues (Pradhan et al., 2013; Alexander et al., 2019). In previous studies, we have reported physiologically relevant interactions in which the GHS-R1a receptor is involved. A functional unit composed of GHS-R1a and the dopamine D₁ receptor mediates, at least in part, the hunger-suppressing actions of cocaine; in a macromolecular complex that also includes the non-GPCR sigma-1 receptor, a dual coupling is possible; that is, the coupling to two G proteins makes it possible for ghrelin to act through cAMP rather than through Ca²⁺ and dopamine to signal *via* increases in cytoplasmic Ca²⁺ rather than through cAMP (Casanovas et al., 2021). The ghrelin receptor is also able to interact with the CB₂ cannabinoid receptor in both heterologous cells and in cells of the central nervous system. Cannabinoids acting on the CB₂ receptor do not alter the cytosolic Ca²⁺ increases triggered by ghrelin. However, ghrelin receptor activation led to a blockade of CB₂ receptor-mediated Gi-dependent signaling (Lillo et al., 2021). The aim of this article was to investigate the potential molecular and/or functional interactions between CB₁ and GHS-R1a receptors. As the risk of obesity is higher in the progeny of obese parents, the interaction between these two receptors was also studied in neurons isolated

from fetuses of mothers on a high-fat diet (Abu-Rmeileh et al., 2008).

MATERIALS AND METHODS

Reagents

ACEA, ghrelin (human), rimonabant hydrochloride, and YIL 781 hydrochloride were purchased from Tocris Bioscience (Bristol, United Kingdom). Concentrated (10 mM) stock solutions prepared in DMSO, milli-Q[®] H₂O (Merck/Millipore, Darmstadt, Germany), or ethanol were stored at -20°C . In each experimental session, aliquots of concentrated solutions of compounds were thawed and conveniently diluted in the appropriate experimental solution.

Diet-Induced Obesity Model

C57BL/6J female mice were used for the experiments. All animals were subjected to a 12 h/12 h light/ dark cycle in a temperature- and humidity-controlled room and were allowed free access to water and standard laboratory chow. C57BL/6J mice were randomly assigned to a high-fat diet (HFD; 60% kcal from fat; catalog no. D12492, Research Diets, New Brunswick, NJ, USA) or standard diet (STD; 10% kcal from fat; catalog no. D12450B, Research Diets) for 60 days. Primary striatal neurons were obtained from fetuses of mothers on STD or HFD diets. Pregnant animals were killed by cervical dislocation during the light phase. All animal procedures were performed in agreement with European guidelines (2010/63/EU) and approved by the University of Barcelona Ethical Committee, which reports to the regional Government (Protocol #9659; Generalitat de Catalunya, May 24, 2019).

Cell Culture and Transient Transfection

Human embryonic kidney HEK-293T (lot 612968) cells were acquired from the American Type Culture Collection (ATCC). They were amplified and frozen in liquid nitrogen in several aliquots. Cells from each aliquot were used until passage 19. HEK-293T cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, Paisley, Scotland, United Kingdom) supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin/streptomycin, MEM Non-Essential Amino Acid Solution (1/100), and 5% (v/v) heat-inactivated Fetal Bovine Serum (FBS; all supplements were from Invitrogen, Paisley, Scotland, United Kingdom). Cells were maintained in a humid atmosphere of 5% CO₂ at 37°C.

Cells were transiently transfected with the corresponding cDNAs using the PEI (PolyEthylenImine, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) method as previously described (Carriba et al., 2008; Hradsky et al., 2011; Navarro et al., 2012). Four hours after transfection, growth medium was replaced by a complete medium. Experiments were carried out 48 h later.

To prepare primary striatal neurons, brains from fetuses of pregnant mice were removed (gestational age: 17 days). Neurons were isolated as described in Hradsky et al. (2013) and plated at a confluence of 40,000 cells/0.32 cm². Briefly, the samples were dissected and, after careful removal of the meninges, digested for 20 min at 37°C with 0.25% trypsin. Trypsinization

was stopped by adding an equal volume of culture medium (Dulbecco's modified Eagle medium-F-12 nutrient mixture, Invitrogen). Cells were brought to a single cell suspension by repeated pipetting followed by passage through a 100 μm -pore mesh. Pelleted (7 min, 200 \times g) cells were resuspended in supplemented DMEM and seeded at a density of 3.5×10^5 cells/ml. The next day, the medium was replaced by neurobasal medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin/streptomycin, and 2% (v/v) B27 medium (Gibco). Neuronal cultures were used for assays after 15 days of culture. Using NeuN as a marker, the percentage of neurons in the cultures was >90%.

Expression Vectors

The human cDNAs for the CB₁R, GHS-R1a, and D₁R cloned in pcDNA3.1 were amplified without their stop codons using sense and antisense primers. The primers harbored either unique BamHI and KpnI sites for CB₁R and HindIII and BamHI sites for GHS-R1a and D₁R. The fragments were subcloned to be in frame with an enhanced yellow fluorescent protein (pEYFP-N1; Clontech, Heidelberg, Germany) and the Renilla luciferase protein (Rluc; pRluc-N1; PerkinElmer, Wellesley, MA) on the C-terminal end of the receptor to produce CB₁R-YFP, D₁R-Rluc, and GHS-R1a-Rluc.

Immunofluorescence

HEK-293T cells transfected with cDNAs for CB₁R-YFP and GHS-R1a-Rluc were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min and then washed twice with PBS containing 20 mM glycine before permeabilization with the same buffer containing 0.2% Triton X-100 (5 min incubation). The samples were treated for 1 h with blocking solution (PBS containing 1% bovine serum albumin) and labeled with a mouse anti-Rluc (1/100; MAB4400, Millipore, Burlington, MA, USA) as primary antibody and subsequently treated with Cy3-conjugated anti-mouse IgG (1/200; 715-166-150; Jackson ImmunoResearch) as the secondary antibody (1 h each). The samples were washed several times and mounted with 30% Mowiol (Calbiochem, San Diego, USA). Nuclei were stained with Hoechst (1/100). Samples were observed under a Zeiss 880 confocal microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) Assay

HEK-293T cells growing in 6-well plates were transiently cotransfected with a constant amount of cDNA encoding for GHS-R1a fused to Renilla luciferase (GHS-R1a-Rluc) and with increasing amounts of cDNA corresponding to CB₁ receptor fused to the yellow fluorescent protein (CB₁R-YFP). For negative control, cells were cotransfected with a constant amount of cDNA encoding for D₁R-Rluc and with increasing amounts of cDNA for CB₁R-YFP. Forty-eight hours post-transfection cells were washed twice in quick succession with HBSS (137 mM NaCl; 5 mM KCl; 0.34 mM Na₂HPO₄; 0.44 mM KH₂PO₄; 1.26 mM CaCl₂; 0.4 mM MgSO₄; 0.5 mM MgCl₂; and 10 mM HEPES, pH 7.4) supplemented with 0.1% glucose (w/v), detached by

gently pipetting and resuspended in the same buffer. To have an estimation of the number of cells per plate, protein concentration was determined using a Bradford assay kit (Bio-Rad, Munich, Germany) with bovine serum albumin dilutions for standardization. To quantify YFP-fluorescence expression, cells were distributed (20 μg protein) in 96-well microplates (black plates with a transparent bottom; Porvair, Leatherhead, UK). Fluorescence was read using a Mithras LB 940 (Berthold, Bad Wildbad, Germany) equipped with a high-energy xenon flash lamp, using a 10-nm bandwidth excitation and emission filters at 485 and 530 nm, respectively. YFP-fluorescence expression was determined as the fluorescence of the sample minus the fluorescence of cells expressing only protein-Rluc. For the BRET measurements, the equivalent of 20 μg of cell suspension was distributed in 96-well microplates (white plates; Porvair), and 5 μM coelenterazine H was added (PJK GMBH, Kleinblittersdorf, Germany). Then, 1 min after coelenterazine H addition, the readings were collected using a Mithras LB 940 (Berthold, Bad Wildbad, Germany), which allowed the integration of the signals detected in the short-wavelength filter at 485 nm (440–500 nm) and the long-wavelength filter at 530 nm (510–590 nm). To quantify receptor-Rluc expression, luminescence readings were collected 10 min after 5 μM coelenterazine H addition. The net BRET is defined as [(long-wavelength emission)/(short-wavelength emission)]-Cf where Cf corresponds to [(long-wavelength emission)/(short-wavelength emission)] for the Rluc construct expressed alone in the same experiment. The BRET curves were fitted assuming a single phase by a non-linear regression equation using the GraphPad Prism software (San Diego, CA, USA). BRET values are given as milli-BRET units (mBU: 1000 \times net BRET).

cAMP Determination

HEK-293T cells transfected with the cDNAs for CB₁R (1 μg) and/or GHS-R1a (1.5 μg) and neuronal primary cultures were plated in 6-well plates. Two hours before initiating the experiment, the cell-culture medium was replaced by the non-supplemented DMEM medium. Then, cells were detached, resuspended in the non-supplemented DMEM medium containing 50 μM zardaverine, and plated in 384-well microplates (2,500 cells/well). Cells were pretreated (15 min) with the corresponding antagonists (1 μM rimonabant for CB₁R and 1 μM YIL 781 for GHS-R1a) or vehicle and stimulated with agonists (1 nM, 10 nM, 100 nM, and 1 μM ACEA for CB₁R or 200 nM ghrelin for GHS-R1a; 15 min) before the addition of 0.5 μM FK or vehicle. Finally, the reaction was stopped by the addition of the Eu-cAMP tracer and the ULight-conjugated anti-cAMP monoclonal antibody prepared in the "cAMP detection buffer" (PerkinElmer). All steps were performed at 25°. Homogeneous time-resolved fluorescence energy transfer (HTRF) measures were performed after 60 min incubation at RT using the Lance Ultra cAMP kit (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Fluorescence at 665 nm was analyzed on a PHERAstar Flagship microplate reader equipped with an HTRF optical module (BMG Lab Technologies, Offenburg, Germany).

MAPK Phosphorylation Assays

To determine extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) phosphorylation, HEK-293T transfected cells and primary striatal neurons were plated (50,000 cells/well) in transparent Deltalab 96-well plates and kept in the incubator for 15 days. Two hours before the experiment, the medium was replaced by non-supplemented DMEM medium. Next, the cells were pre-treated at RT for 10 min with antagonists (1 μ M rimonabant for CB₁R and YIL 781 for GHS-R1a) or vehicle and stimulated for an additional 7 min with selective agonists (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M ACEA for CB₁R and 200 nM ghrelin for GHS-R1a). Then, cells were washed twice with cold PBS before the addition of 30 μ l/well “Ultra lysis buffer” -PerkinElmer- (15 min treatment). Afterward, 10 μ l of each supernatant was placed in white ProxiPlate 384-well plates and ERK1/2 phosphorylation was determined using an AlphaScreen[®]SureFire[®] kit (PerkinElmer), following the instructions of the supplier, and using an EnSpire[®] Multimode Plate Reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). The reference value (100%) was the value achieved in the absence of any treatment (basal). Agonist effects were given in percentage with respect to the basal value.

Real-Time Determination of Calcium Ion Cytoplasmic Level Variation

HEK-293T cells were transfected with the cDNAs for CB₁R (1 μ g) and/or GHS-R1a (1.5 μ g) in the presence of 1 μ g cDNA for the calmodulin-based calcium GCaMP6 sensor (Chen et al., 2013) using the PEI method. 48 h after transfection, cells were detached using Mg²⁺-free Locke's buffer (pH 7.4; 154 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 3.6 mM NaHCO₃, 2.3 mM CaCl₂, 5.6 mM glucose and 5 mM HEPES) supplemented with 10 μ M glycine. 1,500 cells per well were plated in 96-well black, clear-bottom, microtiter plates. Then, cells were incubated for 10 min with the CB₁R and GHS-R1a antagonists (1 μ M rimonabant or 1 μ M YIL 781), and subsequently stimulated with selective agonists (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M ACEA, or 200 nM ghrelin). Upon excitation at 488 nm, real-time 515 nm fluorescence emission due to calcium-ion complexed GCaMP6 was recorded on the EnSpire[®] Multimode Plate Reader (every 5 s, 100 flashes per well).

Proximity Ligation Assays (PLAs)

Physical interaction between CB₁R and GHS-R1a was detected using the Duolink *in situ* PLA detection Kit (OLink; Bioscience, Uppsala, Sweden) following the instructions of the supplier. Primary neurons were grown on glass coverslips, fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min, washed with PBS containing 20 mM glycine to quench the aldehyde groups, and permeabilized with the same buffer containing 0.05% Triton X-100 (20 min). Then, samples were successively washed with PBS. After 1 h incubation at 37°C with the blocking solution in a pre-heated humidity chamber, primary neurons were incubated overnight in the antibody diluent medium with a mixture of equal amounts of mouse anti-CB₁R (1/100; sc-293419, Santa Cruz Technologies, Dallas, TX, USA) and rabbit anti-GHS-R1a (1/100; ab95250, Abcam, Cambridge, United Kingdom) to detect CB₁R-GHS-R1a complexes. Neurons were processed

using the PLA probes detecting primary antibodies (Duolink II PLA probe plus and Duolink II PLA probe minus) diluted in the antibody diluent solution (1:5). Ligation and amplification were done as indicated by the supplier. Samples were mounted using the mounting medium with Hoechst (1/100; Sigma-Aldrich) to stain nuclei. Samples were observed in a Zeiss 880 confocal microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with an apochromatic 63 \times oil immersion objective (N.A. 1.4) and a 405 nm and a 561 nm laser lines. For each field of view, a stack of two channels (one per staining) and four Z stacks with a step size of 1 μ m were acquired. The number of neurons containing one or more red spots vs. total cells (blue nucleus) was determined, and the unpaired t-test was used to compare the values (red dots/cell) obtained.

RESULTS

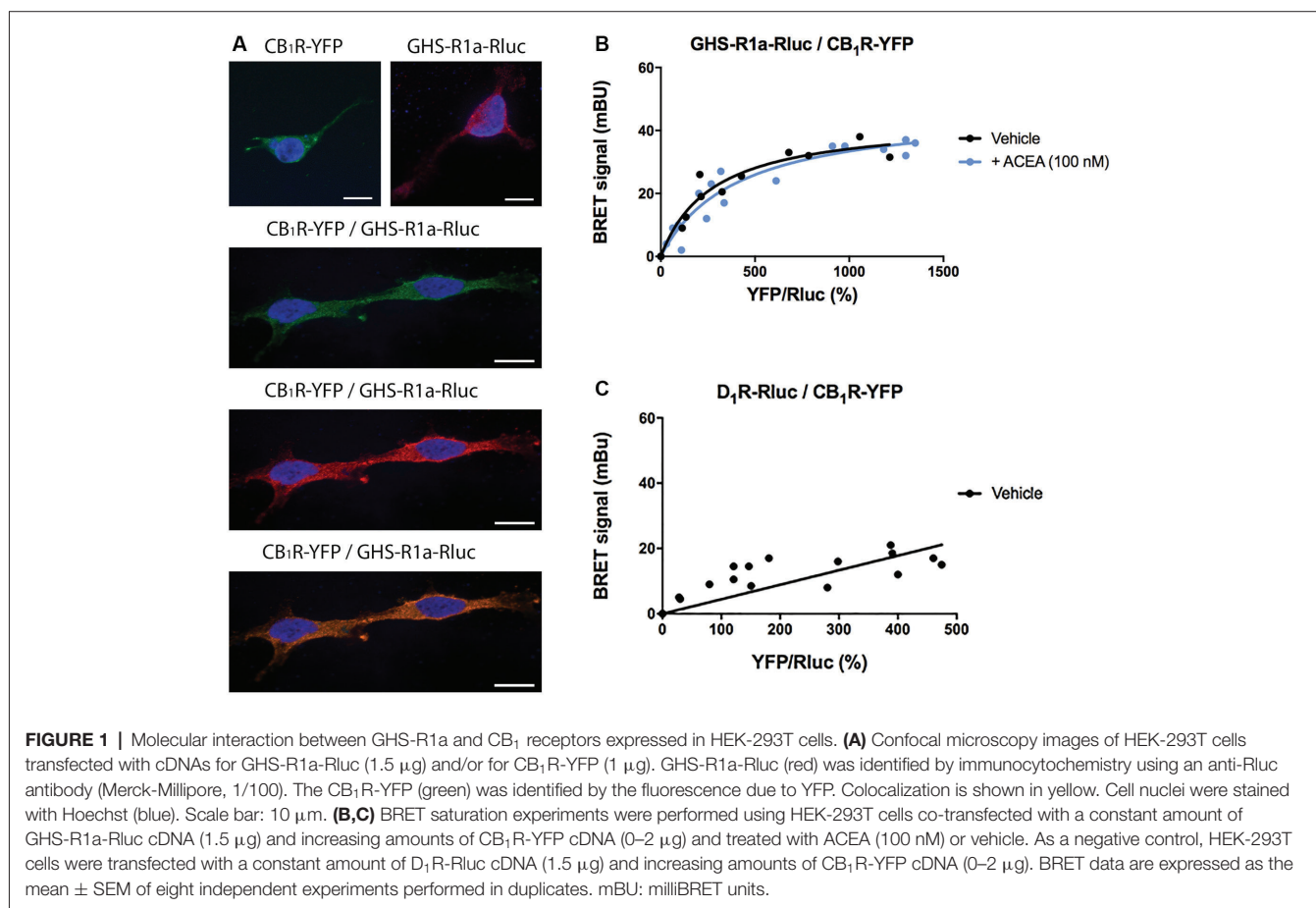
The CB₁R May Interact With the GHS-R1a

Cannabis sativa L consumption has an orexigenic effect *via* a mechanism in which a hormone of the endocrine system, ghrelin, participates. To identify whether or not there are functional interactions between the cannabinoidergic and the orexinergic systems, we first tested a potential interaction between the CB₁R and the functional form of the ghrelin receptor, GHS-R1a. Immunocytochemical assays in HEK-293T cells transfected with the cDNA of the GHS-R1a fused to Renilla luciferase (Rluc) and/or the cDNA for the CB₁R fused to the Yellow Fluorescent Protein (YFP) led to detect the receptors at the plasma membrane level with a marked colocalization when coexpressed (Figure 1A).

As colocalization may be found for proteins that are close (approximately 200 nm apart) but may not be directly interacting, a Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) assay was performed in HEK-293T cells cotransfected with a constant amount of the cDNA for GHS-R1a-Rluc and increasing amounts of cDNA for CB₁R-YFP. A saturation curve (BRET_{max} = 44 \pm 4 mBU, BRET₅₀ = 280 \pm 70) was obtained, demonstrating a direct interaction between the two receptors in this heterologous expression system (Figure 1B). When the same experiment was performed in cells pretreated for 30 min with the selective CB₁R agonist, arachidonyl-2'-chloroethylamide (ACEA, 100 nM), no significant differences were observed (BRET_{max} = 47 \pm 4 mBU, BRET₅₀ = 400 \pm 10). This result indicates that CB₁R-GHS-R1a interaction is not affected by the activation of the CB₁R. As a negative control, HEK-293T cells were transfected with a constant amount of dopamine D₁ receptor-Rluc cDNA and increasing amounts of CB₁R-YFP cDNA; the nonspecific linear signal indicates a lack of interaction between these two proteins (Figure 1C).

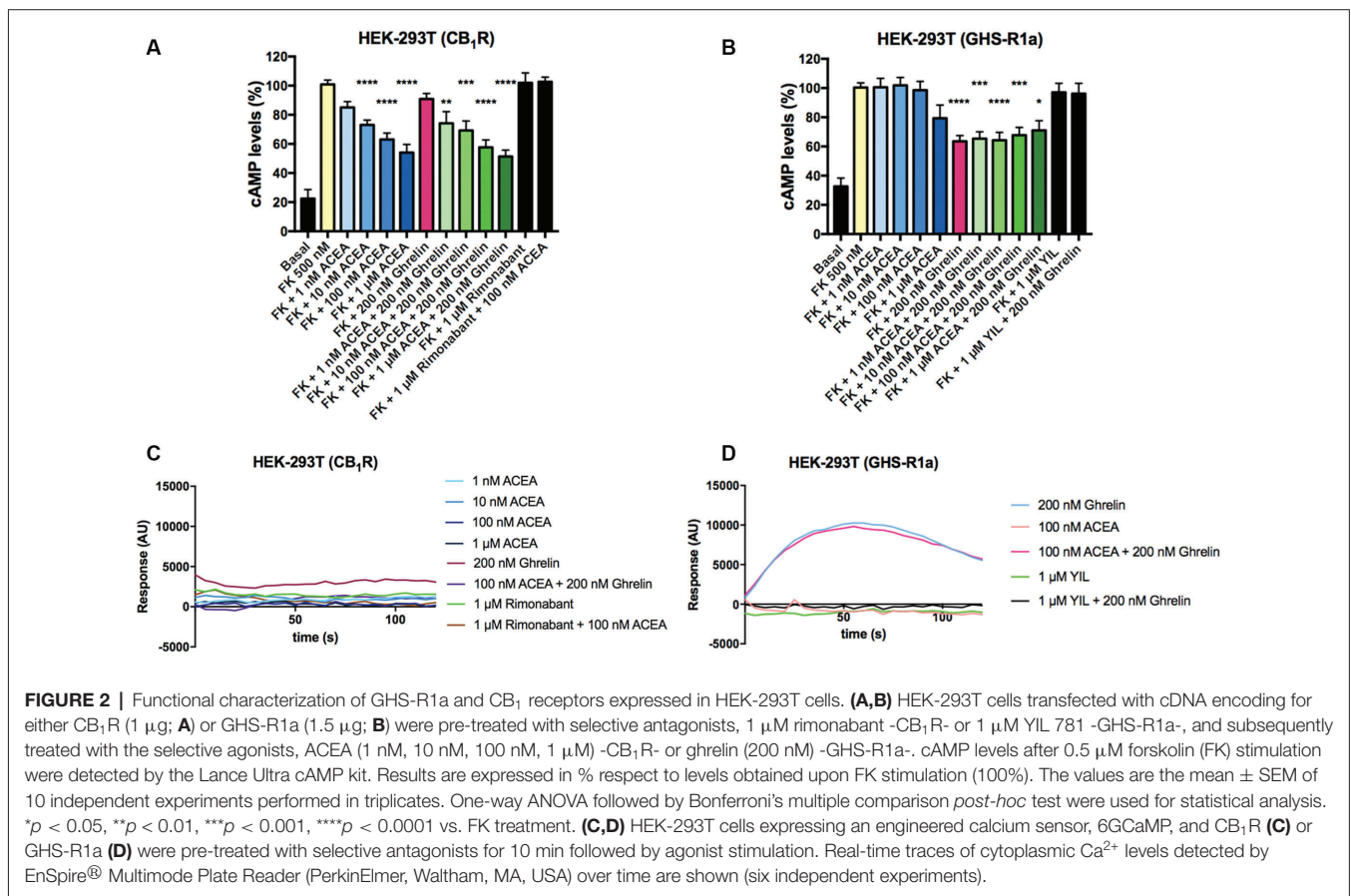
CB₁R-Mediated Signaling Is Blocked in the CB₁-GHS-R1a Receptor Heteromer (CB₁R-GHS-R1aHet)

After identifying a direct interaction between CB₁R and GHS-R1a, the functional consequences of the interaction were investigated. Signaling assays were performed considering that



the CB₁R couples to G_i and that, although the canonical protein that couples to GHS-R1a receptor is G_q, the ghrelin receptor may also couple to G_i. The activation of any of the receptors in the presence of forskolin (FK), which activates adenylate cyclase, led to a decrease in cytosolic cAMP levels in HEK-293T cells expressing CB₁R or GHS-R1a. In cells expressing the CB₁R, the selective agonist, arachidonyl-2'-chloroethylamide (ACEA), led to a dose-response decrease in (FK)-stimulated cAMP levels that were not affected by pretreatment with ghrelin. Moreover, ghrelin treatment induced no effect over cannabinoid CB₁R, demonstrating ligand selectivity. The effect of ACEA was specific as it was blocked by a selective CB₁R antagonist, rimonabant (**Figure 2A**). In cells expressing the GHS-R1a, 200 nM ghrelin induced a significant (circa 30%) decrease of FK-induced cAMP level that was not affected by ACEA but that was completely counteracted by YIL 781, a selective GHS-R1a receptor antagonist (**Figure 2B**). It was confirmed that ACEA did not induce any effect over the GHS-R1a. When the G_q coupling was assayed using the GCaMP6 sensor of cytoplasmic Ca²⁺, no signal was obtained in cells expressing the CB₁R (**Figure 2C**), while in cells expressing the GHS-R1a receptor ghrelin lead to a transient peak of cytosolic [Ca²⁺] that was not modified by preincubation with ACEA but that was prevented upon preincubation with the ghrelin receptor antagonist (**Figure 2D**).

In HEK-293T cells expressing CB₁ and GHS-R1a receptors, the ghrelin-induced decrease of FK-stimulated cAMP levels was significant although lower than that in cells only expressing the ghrelin receptor (37% vs. 15%; **Figure 3A**). Interestingly, the presence of the ghrelin receptor uncoupled CB₁R activation from G_i protein, at least at a functional level. In fact, ACEA even at the highest concentration (1 μM) was not able to significantly reduce FK-induced cAMP levels. Functionality was, however, found when cells were treated with ghrelin and there was no additive effect at concentration of 10 nM ACEA or higher; the lower concentration of ACEA (1 nM) showed a trend to increase the ghrelin-induced effect (**Figure 3A**). Results related to G_q coupling were noteworthy as ACEA, which did not lead to calcium ion mobilization by itself, significantly increased the effect of ghrelin. Remarkably, the potentiation was much stronger at low doses of ACEA (1 nM) than at higher concentrations (**Figure 3B**). In particular, the 40 s post-activation increase provided by the presence of 1 nM, 10 nM or 100 nM ACEA over the signal provided by 200 nM ghrelin, was (in percentage), 140 ± 30, 65 ± 30, and 71 ± 15, respectively. Finally, as GHS-R1a and CB₁ receptor agonists lead to activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway (Mousseaux et al., 2006; Daigle et al., 2008; Navarro et al., 2018b), we tested the properties of the heteromer in the link to the MAPK signaling pathway. Again, the effect of



the cannabinoid receptor agonist was suppressed when the two receptors were co-expressed, while the effect of ghrelin was not modified by low doses of ACEA but was diminished when higher doses were used (**Figure 3C**). In a control assay, it was confirmed that ACEA does increase ERK1/2 phosphorylation, as previously reported (Navarro et al., 2018a,b). These data demonstrate that cannabinoids may regulate GHS-R1a function depending on the concentration and that GHS-R1a expression suppresses cannabinoid receptor-mediated events supposedly by the establishment of heteromeric complexes.

Cross-Talk Characterization

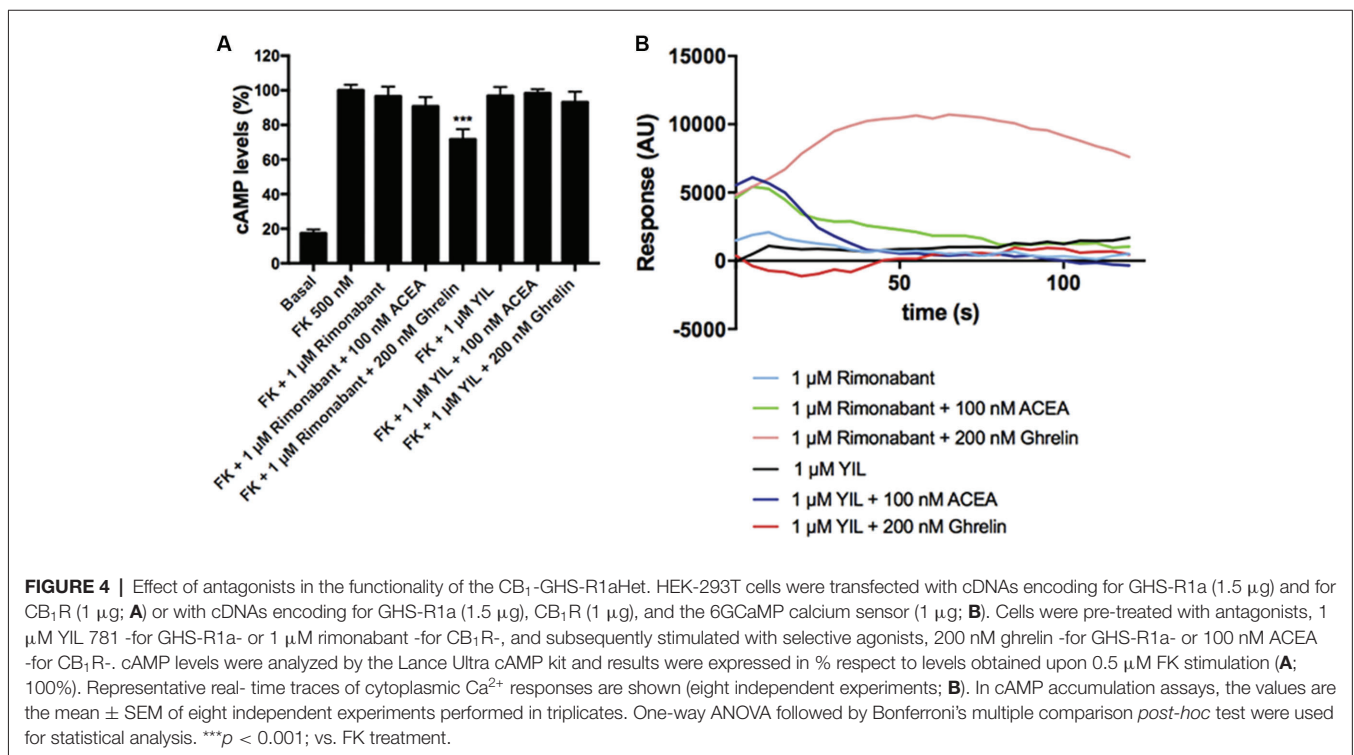
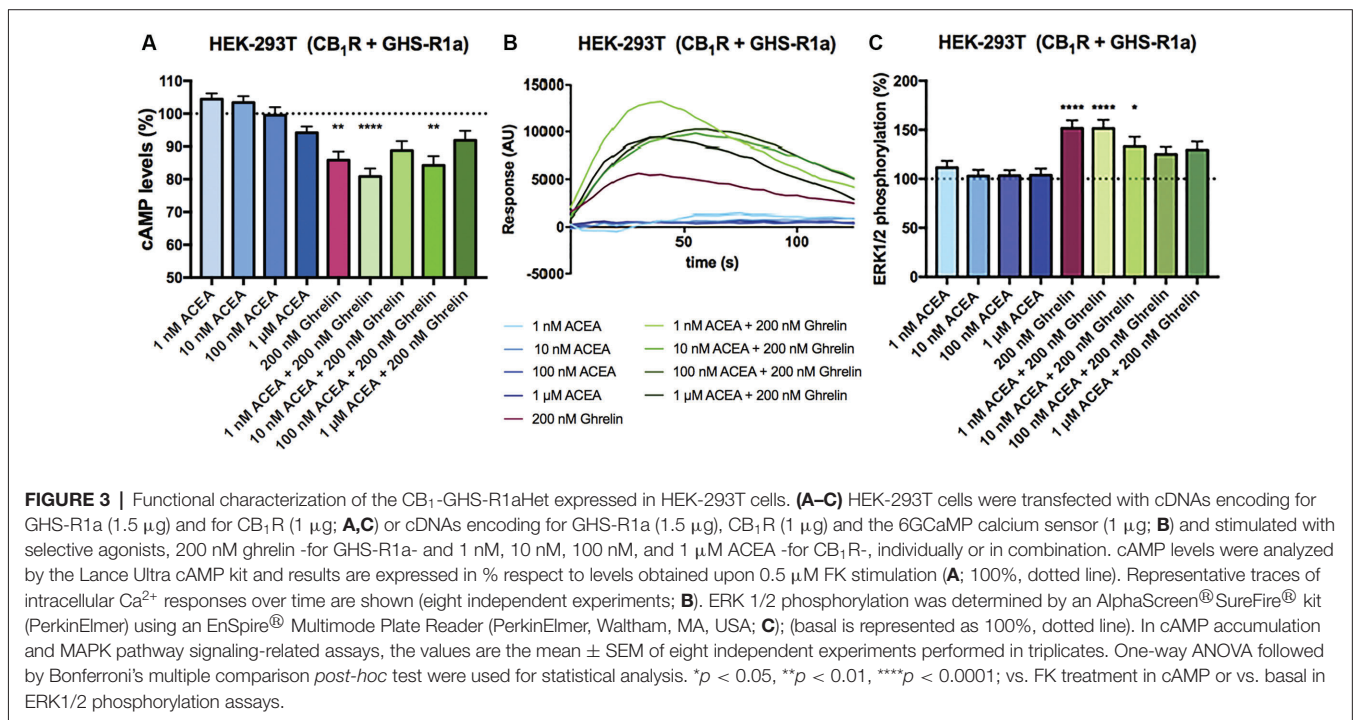
In the 90s different laboratories proved interactions between GPCRs to form heteromeric complexes. These complexes can be detected by energy transfer techniques in heterologous expression systems or by proximity ligation assays (PLA) in natural sources, either primary cultures or tissue sections. An often-found property of a heteromer formed by two GPCRs is that the antagonist of one of the receptors not only blocks the signaling originated at the receptor but also the signaling originated at the partner receptor. Such cross-antagonism, which is due to conformational changes transmitted from one receptor to the other, may serve as a print to detect the heteromer. Another possibility is that coactivation leads to a smaller effect than that obtained upon activating only one receptor of the complex; this phenomenon is known as

negative crosstalk. Finally, in some cases, the antagonist of one receptor may restore the signaling *via* the partner receptor in the heteromer.

To study the effect of antagonists, HEK-293T cells expressing CB₁ and GHS-R1a receptors were pretreated with the selective antagonists before agonist stimulation. As observed in **Figure 4A**, the CB₁R antagonist, rimonabant, did not block G_i-mediated ghrelin-induced effect, whereas the GHS-R1a antagonist, YIL 781, which completely blocked ghrelin-induced decrease of FK-induced cAMP levels, did not restore the CB₁R-G_i coupling. Accordingly, there was no cross-antagonism in GHS-R1a/G_i-mediated signaling when the CB₁ receptor was blocked by a selective antagonist. Similar were results in **Figure 4B**, i.e., there was no cross-antagonism in GHS-R1a receptor/G_q-mediated signaling when the CB₁R receptor was blocked by a selective antagonist. In summary, neither cross-antagonism nor restoration of CB₁R-G_i coupling was observed when addressing direct G_i- or direct G_q-induced outputs using selective antagonists.

Effect of Ghrelin and/or ACEA in Primary Striatal Neurons

After demonstrating the functionality of CB₁R-GHS-R1aHet in transfected HEK-293T cells, we moved to a more physiologic environment to look for the expression of the receptor complex. We investigated the expression and function of



CB₁R-GHS-R1aHet in primary striatal neurons. First, we analyzed the effect of ACEA and ghrelin on FK-induced cAMP. As observed in **Figure 5**, ACEA was able to induce a dose-dependent effect. Ghrelin also decreased the FK-induced cAMP levels. Coactivation with ghrelin and 1 nM ACEA resulted in an additive effect, but not at higher ACEA

concentrations. Moreover, the effect of ACEA was not affected by the antagonists of the GHS-R1a receptor and, reciprocally, the effect of ghrelin was not counteracted by the antagonists of the CB₁R (**Figure 5B**). On the other hand, when analyzing ERK1/2 phosphorylation in striatal primary neurons, both ACEA and ghrelin led to a significant increase

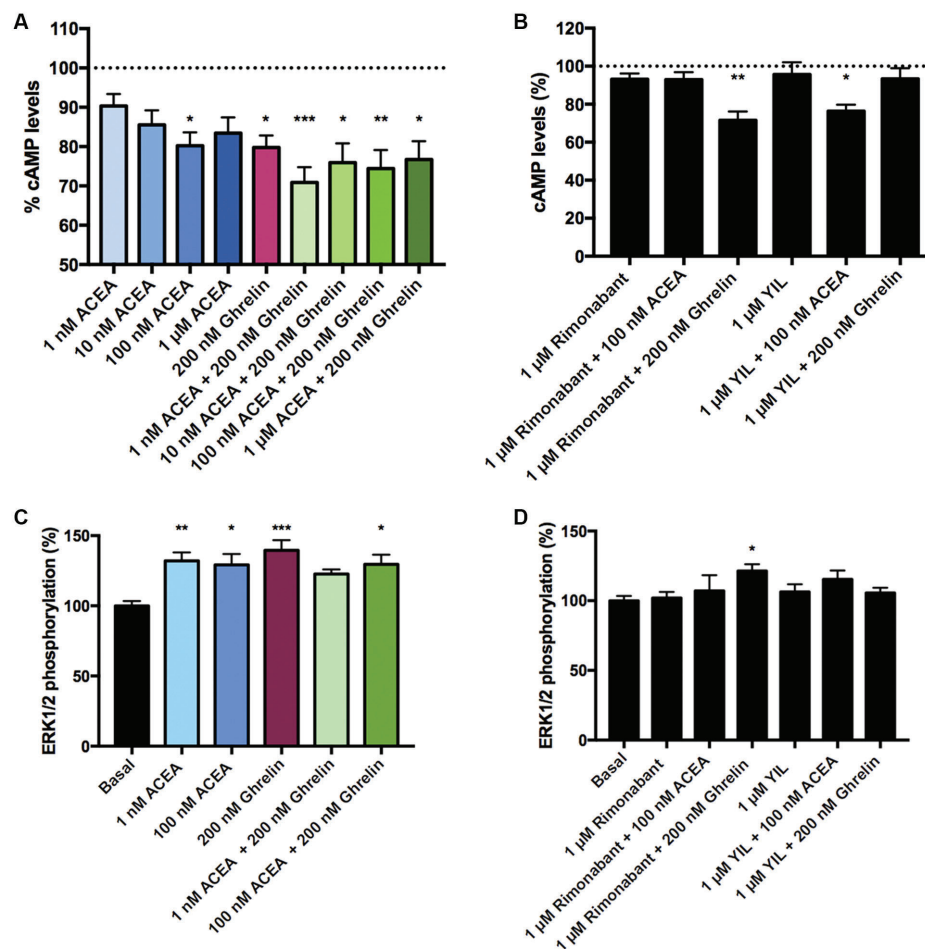


FIGURE 5 | CB₁R-GHS-R1aHet signaling in primary striatal neurons from C57BL/6J mice. Primary striatal neurons obtained from C57BL/6J brain fetuses were pre-treated with selective antagonists, 1 μM YIL 781 -for GHS-R1a- or 1 μM rimobantant -for CB₁R- or vehicle and subsequently stimulated with selective agonists, 200 nM ghrelin -for GHS-R1a- or 1 nM, 10 nM, 100 nM, and 1 μM ACEA -for CB₁R-, individually or in combination. cAMP levels (**A,B**) were collected by the Lance Ultra cAMP kit and results are expressed in % respect to levels obtained upon 0.5 μM FK stimulation (100%, dotted line). ERK1/2 phosphorylation (**C,D**) was analyzed using an AlphaScreen[®]SureFire[®] kit (PerkinElmer) and results are expressed in % respect to basal levels. Values are the mean ± SEM of six independent experiments performed in triplicates. One-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison *post-hoc* tests were used for statistical analysis. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001; vs. FK treatment (**A,B**) or vs. basal (**C,D**).

in phosphorylation levels. In addition, no cross-antagonism was detected in primary neurons pretreated with rimobantant followed by ghrelin stimulation (**Figures 5C,D**). These results suggest that the proportion of CB₁R-GHS-R1aHets in primary striatal cultures is relatively low and that CB₁ and GHS-R1a receptors may be forming complexes with other GPCRs (see “Discussion” section).

The CB₁R-GHS-R1aHet Is Overexpressed in Striatal Neurons Isolated From the Brain of the Progeny of Mothers Under a High-Fat Diet

One of the aims of this study was to correlate the expression of CB₁R-GHS-R1a receptor complexes in a situation of unbalanced energy homeostasis. For this purpose, we used primary striatal

neurons isolated from fetuses of mothers fed a standard (STD) or high fat (HFD) diet (see “Materials and Methods” section). The expression of CB₁R-GHS-R1aHets was assessed by *in situ* proximity ligation assay (PLA). An important increase in the expression of CB₁-GHS-R1a complexes was observed in striatal neurons from fetuses of HFD mothers (18 red dots/cell vs. 3 red dots/cell in neurons from fetuses of STD mothers; **Figures 6A,B**). Moreover, when primary neurons from fetuses of HFD mothers were treated with 1 nM ACEA, a significant decrease in complex expression (12 red dots/cell) was observed; however, a higher concentration of the compound, 100 nM, led to a marked increase in the number of complexes (36 red dots/cell). Remarkably, treatment with 200 nM ghrelin produced a robust increase in CB₁R-GHS-R1a complex expression (>40 red dots/cell; **Figure 6C**). In summary, the expression of the CB₁R-GHS-R1aHet was higher in the progeny of HFD mothers and

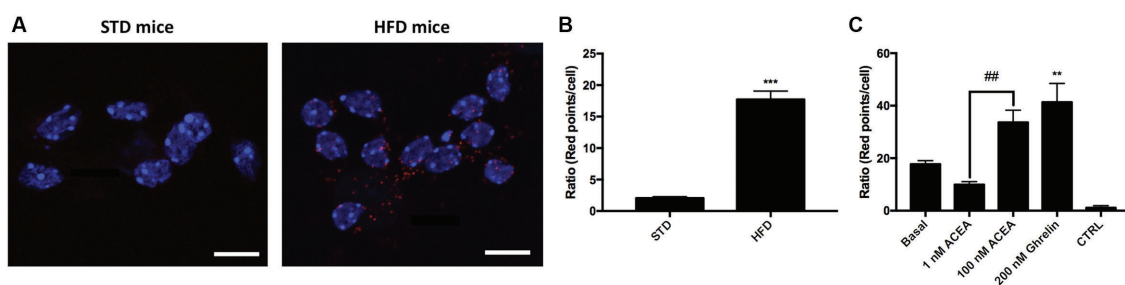


FIGURE 6 | Expression and function of CB₁-GHS-R1aHets in primary striatal neurons isolated from fetuses of pregnant C57BL/6J female mice subjected to a standard (STD) or high-fat (HFD) diet. **(A)** CB₁-GHS-R1aHets were detected by the *in situ* proximity ligation assay (PLA) in primary striatal neurons isolated from the striatum of fetuses from STD or HFD pregnant mothers. Experiments were performed in samples from six animals. **(B,C)** The number of red dots/cell was quantified using Andy's algorithm Fiji's plug-in; nuclei were stained using Hoechst (blue). In **(B)** the number of dots/cell in HFD samples are compared with that in STD samples. In **(C)** neurons obtained from fetuses from HFD mothers were stimulated with 200 nM ghrelin -for GHS-R1a- or 1 nM and 100 nM ACEA -for CB₁R- and analyzed by PLA **(C)**. The negative control was obtained omitting one of the primary antibodies. Scale bar: 10 μm. One-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison *post-hoc* test was used for statistical analysis on comparing to basal or to STD: ****p* < 0.001, vs. STD **(B)** ***p* < 0.01, vs. basal **(C)**. Bonferroni's multiple comparison test showed significance in comparing results from ACEA treatments: ##*p* < 0.01 **(C)**.

may be regulated by ghrelin and, differentially, by cannabinoid concentration.

DISCUSSION

Cannabis has been known and used for years by various civilizations and is used even today. Cannabis use is perceived in two almost opposite ways. One is related to the psychotropic properties of one of its components, (6aR, 10aR)-6,6,9-trimethyl-3-pentyl-6a,7,8,10a-tetrahydro-6H-benzo[*c*]chromen-1-ol, commonly known as THC (or Δ⁹THC; CAS registry number #1972-08-3). It is under question whether the exposure to THC is addictive although it is known that the compound affects homeostatic synaptic plasticity. The good side is the possibility that compounds in *Cannabis sativa L* may be useful to combat a variety of diseases. For instance, dronabinol (Marinol[®]), with an identical chemical structure to THC but of synthetic origin, has been already approved for human use. Also approved are a preparation having an equal amount of THC and cannabidiol (Sativex[®]) and a preparation of pure cannabidiol in vegetable oil (Epidiolex[®]). The main therapeutic indications of these drugs are anti-emetic and spasticity management. Interestingly, a CB₁R antagonist, rimonabant, was approved to combat obesity. The discovery that blockade of the CB₁R could lead to a drop in body weight by reducing food consumption correlated with the well-known orexigenic properties of Cannabis consumption. Unfortunately, the compound, which is brain permeable, was withdrawn due to serious adverse events related to alterations in central functions. Although it was hypothesized that CB₁R antagonists unable to cross the blood-brain barrier could overcome the side effects, there is evidence that the anti-orexigenic actions of CB₁R antagonists are due to, at least in part, the blockade of receptors in the central nervous system where the CB₁ is the most abundant GPCR (Carai et al., 2006; Christensen et al., 2007; Sam et al., 2011; Tudge et al., 2015). In this scenario, we aimed at defining possible interactions between cannabinoid receptors and the receptor for the so-called

“hunger” hormone, ghrelin. In a recent article, we have shown the interaction of the cannabinoid CB₂ receptor (CB₂R) with the GHS-R1a receptor in a heterologous expression system and in physiological cell models (Lillo et al., 2021). Therefore, the first aim of the present study was to address the possible interaction between the ghrelin receptor and the CB₁R and to characterize the functional consequences of such interaction. Both, the previous and the present studies demonstrate that the GHS-R1a receptor may interact with either CB₁ or CB₂ receptors and that the resulting heteromers may occur in physiological environments.

At the functional level, allosteric interactions within CB₁R-GHS-R1aHets and of CB₂R-GHS-R1aHets lead to the blockade of cannabinoid receptor/G_i-mediated signaling. The blockade occurs just by simple co-expression, i.e., it does not require the activation of the GHS-R1a receptor. Taking these results together, cells expressing cannabinoid and ghrelin receptors heteromers on the cell surface would not be responsive to cannabinoids, or even to endocannabinoids, unless there is a pool of cell surface CB₁Rs that are not interacting with the ghrelin receptor.

Several phytocannabinoids are able to cross the blood-brain barrier (Sagredo et al., 2007; Lafuente et al., 2011; Espejo-Porras et al., 2013; García et al., 2016; Libro et al., 2016; Palomogaro et al., 2016; Zeissler et al., 2016; Valdeolivas et al., 2017; Haider et al., 2018; Franco et al., 2020) and reach the brain reward circuits in which ghrelin acts. Ghrelin receptors in reward circuits mediate the control of food intake (Guan et al., 1997; Funahashi et al., 2003; Geelissen et al., 2003; Argente-Arizón et al., 2015; Cassidy and Tong, 2017). Our data indicate a blockade of G_i/CB₁R coupling but a potentiation induced by cannabinoids of the GHS-R1a/G_q-mediated events, namely a potentiation in calcium-mediated signaling. In our opinion, the higher potentiation at low doses of the CB₁R agonist (1 nM) is physiologically relevant. It is tempting to speculate that the atypical effect depending on the dose, i.e., higher potentiation at lower doses underlies previous results in humans and mice showing that low doses of THC are associated with hyperphagia,

whereas high doses suppress it (Simon and Cota, 2017). As previously highlighted, endocannabinoid tone may be important in controlling the inputs received by the reward circuits and that impact on food intake, especially as it relates to the hedonic part of eating (Coccurello and Maccarrone, 2018). Whereas cannabinoids acting on the CB₁ receptor affected calcium mobilization mediated by GHS-R1a-G_q coupling, this is not the case for the CB₂R-GHS-R1aHet (Lillo et al., 2021). As further discussed below, caution must be taken when trying to make general conclusions as the allosteric-cross interactions will occur in neurons expressing CB₁R and GHS-R1a receptors and also CB₁R-GHS-R1aHets; i.e., not all neurons express the two receptors, and a given neuron may express the CB₁R-GHS-R1aHet plus other CB₁R-containing heteromers (see, in <http://www.gpcr-hetnet.com/>, GPCRs that interact with the CB₁R; accessed on October 22, 2021).

As the risk to be obese is higher in families with a history of overweighted individuals, we reasoned that the expression of the heteromer could be altered in the offspring of high-fat-diet mouse mothers as they have more risk to be obese. Compared with samples from fetuses of mothers subjected to STD, there was a marked increase of CB₁R-GHS-R1aHets expression in striatal neurons from siblings of pregnant female mice under a high-fat diet. Such an increase in heteromer expression might be implicated in the obesity predisposition of the progeny of obese parents (Abu-Rmeileh et al., 2008). Upregulation of the CB₁R-GHS-R1aHet in siblings of mothers fed with HFD suggests that already at birth, these mice have a compromised CB₁R function. In addition, we observed that the number of heteromers markedly increased by activation of either the CB₁ with 100 nM ACEA or the GHS-R1a receptors with ghrelin. The upregulation induced by ACEA treatment in neurons did not occur in transfected HEK-293T cells, where ACEA pretreatment does not alter the BRET saturation curve. Also noteworthy is the fact that treatments are short, i.e., changes in expression are not due to regulation of gene expression but to conformational rearrangements within the receptor-receptor and receptor-G protein interactions. Another piece of information is that, in our hands, the CB₁R/G_i-mediated effect of 100 nM ACEA observed in striatal primary neurons was completely blocked in transfected HEK-293T cells expressing the CB₁R-GHS-R1aHet. This result indicates that not all striatal neurons express the heteromer and/or that the CB₁R in a given neuron may be interacting with receptors other than the GHS-R1aHet, i.e., with receptors that are not allosterically blocking CB₁R-mediated signaling. In the so called “*hedonic eating*” by Coccurello and Maccarrone (2018), dopamine plays a key role in the reward circuits. Accordingly, dopamine receptors may be considered in the overall picture. In this sense, the CB₁R may interact with dopamine receptors; it has been reported that the cannabinoid receptor may, at least, interact with the dopamine D₂ receptor (Jarrhian et al., 2004; Navarro et al., 2008; Marcellino et al., 2008; Przybyla and Watts, 2010; Khan and Lee, 2014; Köfalvi et al., 2020), reviewed in García et al. (2016). Cannabinoid CB₁/dopamine D₂ receptor-receptor interaction is bidirectional and may result in functional antagonism, i.e., a CB₁R agonist blocking the D₂R-mediated

modulation of locomotor activity (Marcellino et al., 2008) or in a shift from G_i to G_s coupling and signaling (Bagher et al., 2017).

In conclusion, the benefits of cannabinoids acting on populations of striatal neurons expressing CB₁R-GHS-R1aHet would be lost by the blockade exerted by the ghrelin receptor, thus prevailing the effect of such cannabinoids on other systems such as the dopaminergic. On the other hand, the CB₁R-GHSR1aHet coactivated by ghrelin and cannabinoids provides a more robust calcium response. Such bursts in the concentration of cytosolic calcium must be relevant since calcium regulates almost any event of neuronal physiology. Our results suggest the potential for GHS-R1a receptor antagonists, which could offer a double benefit: (i) reduce food intake and (ii) revert the detrimental effects of HFD on the functionality of the CB₁R in striatal neurons.

It is quite likely that the CB₁R-GHSR1aHet does occur in given subpopulations of neurons. Therefore, the next stage would be an accurate description, at the anatomical and cellular levels, of the regions and specific neurons where the two receptors are co-expressed.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by University of Barcelona Ethical Committee, which reports to the regional Government (Protocol #9659; Generalitat de Catalunya, May 24, 2019).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

GN and RF: conceptualization, supervision, and writing—original draft. RF: data curation. AL, JL, and GN: formal analysis. AL, JL, IR, FD, CM, and GN: investigation, writing—review and editing. AL, JL, and IR: methodology. AL: project administration. CM, GN, and RF: resources. GN: validation. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was partially supported by the AARFD-17-503612 grant the US Alzheimer’s Association, and by grants SAF2017-84117-R and PID2020-113430RB-I00 funded by Spanish MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and, as appropriate, by “ERDF A way of making Europe”, by the “European Union” or by the “European Union Next Generation EU/PRTR”. The research group of the University of Barcelona is considered of excellence (grup

consolidat #2017 SGR 1497) by the Regional Catalanian Government, which does not provide any specific funding for reagents or for payment of services or Open Access fees.

REFERENCES

- Abizaid, A., and Horvath, T. L. (2008). Brain circuits regulating energy homeostasis. *Regul. Pept.* 149, 3–10. doi: 10.1016/j.regpep.2007.10.006
- Abu-Rmeileh, N. M. E., Hart, C. L., McConnachie, A., Upton, M. N., Lean, M. E. J., and Watt, G. C. M. (2008). Contribution of midparental BMI and other determinants of obesity in adult offspring. *Obesity* 16, 1388–1393. doi: 10.1038/oby.2008.211
- Alexander, S. P., Christopoulos, A., Davenport, A. P., Kelly, E., Mathie, A., Peters, J. A., et al. (2019). The concise guide to pharmacology 2019/20: G protein-coupled receptors. *Br. J. Pharmacol.* 176, S21–S141. doi: 10.1111/bph.14748
- Alexander, S. P., Christopoulos, A., Davenport, A. P., Kelly, E., Mathie, A., Peters, J. A., et al. (2021). The concise guide to pharmacology 2021/22: G protein-coupled receptors. *Br. J. Pharmacol.* 178, S27–S156. doi: 10.1111/bph.15538
- Argente-Arizona, P., Freire-Regatillo, A., Argente, J., and Chowen, J. A. (2015). Role of non-neuronal cells in body weight and appetite control. *Front. Endocrinol.* 6:42. doi: 10.3389/fendo.2015.00042
- Bagher, A. M., Laprairie, R. B., Toguri, J. T., Kelly, M. E. M., and Denovan-Wright, E. M. (2017). Bidirectional allosteric interactions between cannabinoid receptor 1 (CB1) and dopamine receptor 2 long (D2L) heterotetramers. *Eur. J. Pharmacol.* 813, 66–83. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.07.034
- Carai, M. A. M., Colombo, G., Maccioni, P., and Gessa, G. L. (2006). Efficacy of rimonabant and other cannabinoid CB1 receptor antagonists in reducing food intake and body weight: preclinical and clinical data. *CNS Drug Rev.* 12, 91–99. doi: 10.1111/j.1527-3458.2006.00091.x
- Carriba, P., Navarro, G., Ciruela, F., Ferré, S., Casadó, V., Agnati, L., et al. (2008). Detection of heteromerization of more than two proteins by sequential BRET-FRET. *Nat. Methods* 5, 727–733. doi: 10.1038/nmeth.1229
- Casanovas, M., Jiménez-Rosés, M., Cordoní, A., Lillo, A., Vega-Quiroga, I., Izquierdo, J., et al. (2021). Discovery of a macromolecular complex mediating the hunger suppressive actions of cocaine: structural and functional properties. *Addict. Biol.* 26:e13017. doi: 10.1111/adb.13017
- Cassidy, R. M., and Tong, Q. (2017). Hunger and satiety gauge reward sensitivity. *Front. Endocrinol.* 8:104. doi: 10.3389/fendo.2017.00104
- Chen, T.-W., Wardill, T. J., Sun, Y., Pulver, S. R., Renninger, S. L., Baohan, A., et al. (2013). Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* 499, 295–300. doi: 10.1038/nature12354
- Christensen, R., Kristensen, P. K., Bartels, E. M., Bliddal, H., and Astrup, A. (2007). Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: a meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 370, 1706–1713. doi: 10.1016/S0140-6736(07)61721-8
- Coccarello, R., and Maccarrone, M. (2018). Hedonic eating and the “delicious circle”: from lipid-derived mediators to brain dopamine and back. *Front. Neurosci.* 12:271. doi: 10.3389/fnins.2018.00271
- Daigle, T. L., Kearn, C. S., and Mackie, K. (2008). Rapid CB1 cannabinoid receptor desensitization defines the time course of ERK1/2 MAP kinase signaling. *Neuropharmacology* 54, 36–44. doi: 10.1016/j.neuropharm.2007.06.005
- Elphick, M. R., and Egertová, M. (2001). The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 356, 381–408. doi: 10.1098/rstb.2000.0787
- Espejo-Porras, F., Fernández-Ruiz, J., Pertwee, R. G., Mechoulam, R., and García, C. (2013). Motor effects of the non-psychotropic phytocannabinoid cannabidiol that are mediated by 5-HT1A receptors. *Neuropharmacology* 75, 155–163. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.07.024
- Franco, R., Rivas-Santisteban, R., Reyes-Resina, I., Casanovas, M., Pérez-Olives, C., Ferreira-Vera, C., et al. (2020). Pharmacological potential of varinic-, minor-, and acidic phytocannabinoids. *Pharmacol. Res.* 158:104801. doi: 10.1016/j.phrs.2020.104801
- Funahashi, H., Takenoya, F., Guan, J.-L., Kageyama, H., Yada, T., and Shioda, S. (2003). Hypothalamic neuronal networks and feeding-related peptides involved in the regulation of feeding. *Anat. Sci. Int.* 78, 123–138. doi: 10.1046/j.0022-7722.2003.00055.x
- García, C., Palomo-Garó, C., Gómez-Gálvez, Y., and Fernández-Ruiz, J. (2016). Cannabinoid-dopamine interactions in the physiology and pathophysiology of the basal ganglia. *Br. J. Pharmacol.* 173, 2069–2079. doi: 10.1111/bph.13215
- Geelissen, S. M. E., Beck, I. M. E., Darras, V. M., Kühn, E. R., Van der Geyten, S., Kuhn, E. R., et al. (2003). Distribution and regulation of chicken growth hormone secretagogue receptor isoforms. *Gen. Comp. Endocrinol.* 134, 167–174. doi: 10.1016/S0016-6480(03)00250-8
- Guan, X., Yu, H., Palyha, O., McKee, K., Feighner, S., Sirinathsinghji, D., et al. (1997). Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Mol. Brain Res.* 48, 23–29. doi: 10.1016/S0169-328X(97)00071-5
- Haider, A., Spinelli, F., Herde, A. M., Mu, B., Keller, C., Margelisch, M., et al. (2018). Evaluation of 4-oxo-quinoline-based CB2 PET radioligands in R6/2 chorea huntington mouse model and human ALS spinal cord tissue. *Eur. J. Med. Chem.* 145, 746–759. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.12.097
- Hradsky, J., Mikhaylova, M., Karpova, A., Kreutz, M. R., and Zuschratter, W. (2013). Super-resolution microscopy of the neuronal calcium-binding proteins Calneuron-1 and Caldendrin. *Methods Mol. Biol.* 963, 147–169. doi: 10.1007/978-1-62703-230-8_10
- Hradsky, J., Raghuram, V., Reddy, P. P., Navarro, G., Hupe, M., Casado, V., et al. (2011). Post-translational membrane insertion of tail-anchored transmembrane EF-hand Ca²⁺-sensor calneurons requires the TRC40/Asna1 protein chaperone. *J. Biol. Chem.* 286, 36762–36776. doi: 10.1074/jbc.M111.280339
- Jarrharian, A., Watts, V. J., and Barker, E. L. (2004). D2 dopamine receptors modulate G α -subunit coupling of the CB1 cannabinoid receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308, 880–886. doi: 10.1124/jpet.103.057620
- Khan, S. S., and Lee, F. J. S. (2014). Delineation of domains within the cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors that mediate the formation of the heterodimer complex. *J. Mol. Neurosci.* 53, 10–21. doi: 10.1007/s12031-013-0181-7
- Köfalvi, A., Moreno, E., Cordoní, A., Cai, N. S., Fernández-Dueñas, V., Ferreira, S. G., et al. (2020). Control of glutamate release by complexes of adenosine and cannabinoid receptors. *BMC Biol.* 18:9. doi: 10.1186/s12915-020-0739-0
- Lafuente, H., Alvarez, F. J., Pazos, M. R., Alvarez, A., Rey-Santano, M. C., Mielgo, V., et al. (2011). Cannabidiol reduces brain damage and improves functional recovery after acute hypoxia-ischemia in newborn pigs. *Pediatr. Res.* 70, 272–277. doi: 10.1203/PDR.0b013e3182276b11
- Libro, R., Diomedea, F., Scionti, D., Piattelli, A., Grassi, G., Pollastro, F., et al. (2016). Cannabidiol modulates the expression of Alzheimer’s disease-related genes in mesenchymal stem cells. *Int. J. Mol. Sci.* 18:26. doi: 10.3390/ijms18010026
- Lillo, J., Lillo, A., Zafra, D. A., Miralpeix, C., Rivas-Santisteban, R., Casals, N., et al. (2021). Identification of the ghrelin and cannabinoid CB2 receptor heteromer functionality and marked upregulation in striatal neurons from offspring of mice under a high-fat diet. *Int. J. Mol. Sci.* 22:8928. doi: 10.3390/ijms22168928
- Lu, H.-C. C., and Mackie, K. (2016). An introduction to the endogenous cannabinoid system. *Biol. Psychiatry* 79, 516–525. doi: 10.1016/j.biopsych.2015.07.028
- Mackie, K. (2005). Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handb. Exp. Pharmacol.* 168, 299–325. doi: 10.1007/3-540-26573-2_10
- Marcellino, D., Carriba, P., Filip, M., Borgkvist, A., Frankowska, M., Bellido, I., et al. (2008). Antagonistic cannabinoid CB1/dopamine D2 receptor interactions in striatal CB1/D2 heteromers. A combined neurochemical and behavioral analysis. *Neuropharmacology* 54, 815–823. doi: 10.1016/j.neuropharm.2007.12.011

ACKNOWLEDGMENTS

In memoriam, María Teresa Miras-Portugal a great scientist in the Purinergic field and a beloved friend of RF.

- Mousseaux, D., Gallic, L. L., Ryan, J., Oiry, C., Gagne, D., Fehrentz, J.-A., et al. (2006). Regulation of ERK1/2 activity by ghrelin-activated growth hormone secretagogue receptor 1A involves a PLC/PKC ϵ pathway. *Br. J. Pharmacol.* 148, 350–365. doi: 10.1038/sj.bjp.0706727
- Navarro, G., Borroto-Escuela, D., Angelats, E., Etayo, I., Reyes-Resina, I., Pulido-Salgado, M., et al. (2018a). Receptor-heteromer mediated regulation of endocannabinoid signaling in activated microglia. Relevance for Alzheimer's disease and levo-dopa-induced dyskinesia. *Brain Behav. Immun.* 67, 139–151. doi: 10.1016/j.bbi.2017.08.015
- Navarro, G., Reyes-Resina, I., Rivas-Santisteban, R., Sánchez de Medina, V., Morales, P., Casano, S., et al. (2018b). Cannabidiol skews biased agonism at cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors with smaller effect in CB₁-CB₂ heteroreceptor complexes. *Biochem. Pharmacol.* 157, 148–158. doi: 10.1016/j.bcp.2018.08.046
- Navarro, G., Carriba, P., Gandía, J., Ciruela, F., Casadó, V., Cortés, A., et al. (2008). Detection of heteromers formed by cannabinoid CB₁, dopamine D₂, and adenosine A_{2A} G-protein-coupled receptors by combining bimolecular fluorescence complementation and bioluminescence energy transfer. *ScientificWorldJournal* 8, 1088–1097. doi: 10.1100/tsw.2008.136
- Navarro, G., Hradsky, J., Lluís, C., Casadó, V., McCormick, P. J., Kreutz, M. R., et al. (2012). NCS-1 associates with adenosine A_{2A} receptors and modulates receptor function. *Front. Mol. Neurosci.* 5:53. doi: 10.3389/fnmol.2012.00053
- Pagotto, U., Cervino, C., Vicennati, V., Marsicano, G., Lutz, B., and Pasquali, R. (2006). How many sites of action for endocannabinoids to control energy metabolism? *Int. J. Obes.* 30, S39–S43. doi: 10.1038/sj.ijo.0803277
- Palomo-Garo, C., Gómez-Gálvez, Y., García, C., and Fernández-Ruiz, J. (2016). Targeting the cannabinoid CB₂ receptor to attenuate the progression of motor deficits in LRRK2-transgenic mice. *Pharmacol. Res.* 110, 181–192. doi: 10.1016/j.phrs.2016.04.004
- Pradhan, G., Samson, S. L., and Sun, Y. (2013). Ghrelin: much more than a hunger hormone. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 16, 619–624. doi: 10.1097/MCO.0b013e328365b9be
- Przybyla, J. A., and Watts, V. J. (2010). Ligand-induced regulation and localization of cannabinoid CB₁ and dopamine D_{2L} receptor heterodimers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 332, 710–719. doi: 10.1124/jpet.109.162701
- Sagredo, O., García-Arencibia, M., de Lago, E., Finetti, S., Decio, A., and Fernández-Ruiz, J. (2007). Cannabinoids and neuroprotection in basal ganglia disorders. *Mol. Neurobiol.* 36, 82–91. doi: 10.1007/s12035-007-0004-3
- Sam, A. H., Salem, V., and Ghatei, M. A. (2011). Rimonabant: from RIO to ban. *J. Obes.* 2011:432607. doi: 10.1155/2011/432607
- Schellekens, H., Dinan, T. G., and Cryan, J. F. (2010). Lean mean fat reducing “ghrelin” machine: hypothalamic ghrelin and ghrelin receptors as therapeutic targets in obesity. *Neuropharmacology* 58, 2–16. doi: 10.1016/j.neuropharm.2009.06.024
- Simon, V., and Cota, D. (2017). Mechanisms in endocrinology: endocannabinoids and metabolism: past, present, and future. *Eur. J. Endocrinol.* 176, R309–R324. doi: 10.1530/EJE-16-1044
- Tudge, L., Williams, C., Cowen, P. J., and McCabe, C. (2015). Neural effects of cannabinoid CB₁ neutral antagonist tetrahydrocannabinovar in on food reward and aversion in healthy volunteers. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 18:pyu094. doi: 10.1093/ijnp/pyu094
- Valdeolivas, S., Sagredo, O., Delgado, M., Pozo, M., and Fernández-Ruiz, J. (2017). Effects of a sativex-like combination of phytocannabinoids on disease progression in R6/2 mice, an experimental model of Huntington's disease. *Int. J. Mol. Sci.* 18:684. doi: 10.3390/ijms18040684
- Zeissler, M.-L., Eastwood, J., McCorry, K., Hanemann, O. C., Zajicek, J. P., and Carroll, C. B. (2016). Δ -9-tetrahydrocannabinol protects against MPP⁺ toxicity in SH-SY5Y cells by restoring proteins involved in mitochondrial biogenesis. *Oncotarget* 7, 46603–46614. doi: 10.18632/oncotarget.10314

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Lillo, Lillo, Raich, Miralpeix, Dosrius, Franco and Navarro. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

3.2. Identification of the ghrelin and cannabinoid CB₂ receptor heteromer functionality and marked upregulation in striatal neurons from offspring of mice under a high-fat diet.

Jaume Lillo*, **Alejandro Lillo***, David A. Zafra, Cristina Miralpeix, Rafael Rivas-Santisteban, Núria Casals, Gemma Navarro[#] i Rafael Franco[#].

Article publicat a la revista *International Journal of Molecular Sciences*, Agost 2021. doi:10.3390/ijms22168928.

Els compostos cannabinoides han estat descrits durant els últims anys com orexigènics, és a dir, amb la capacitat de promoure la ingesta d'aliments, de la mateixa manera que l'hormona orexigènica grelina. L'objectiu principal d'aquest estudi va consistir en determinar la possible interacció molecular i funcional entre el receptor de grelina (GHS-R1a) i el receptor de cannabinoides de tipus 2 (CB₂R) a nivell de membrana plasmàtica. En un sistema heteròleg com són les cèl·lules HEK-293T transfectades, es van identificar complexos tetramèrics de receptors CB₂R-GHS-R1a amb una senyalització pròpia característica que consisteix en un bloqueig de la senyalització G_i del receptor CB₂ per part del receptor GHS-R1a. Aquest bloqueig constitutiu sobre el receptor CB₂ és el resultat de les interaccions al·lostèriques que es produeixen durant la formació del complex heteromèric i es pot revertir amb l'addició de l'antagonista del receptor de grelina, el YIL 781. Per tant, els agonistes cannabinoides que interaccionin amb el receptor CB₂ dins del context heteromèric, no produiran l'activació de la senyalització G_i ni la conseqüent disminució dels nivells d'AMPc intracel·lulars. A més, es va determinar que els compostos cannabinoides que interaccionen amb el CB₂R no afecten la senyalització G_q activada pel receptor de grelina. Mitjançant l'assaig de lligació per proximitat (PLA), es va confirmar l'expressió d'heteròmers CB₂R-GHS-R1a en cultius primaris de neurones estriatals provinents de fetus de ratolins CD-1. Finalment, es va analitzar l'expressió de l'heteròmer CB₂R-GHS-R1a en neurones primàries estriatals de ratolins alimentats amb dieta hipercalòrica, model animal d'obesitat, i es va detectar una sobreexpressió d'aquests complexos heteromèrics en comparació amb els ratolins alimentats amb dieta estàndard (*STD*).



Article

Identification of the Ghrelin and Cannabinoid CB₂ Receptor Heteromer Functionality and Marked Upregulation in Striatal Neurons from Offspring of Mice under a High-Fat Diet

Jaume Lillo ^{1,2,†}, Alejandro Lillo ^{3,†}, David A. Zafra ³, Cristina Miralpeix ⁴, Rafael Rivas-Santisteban ^{1,2}, Núria Casals ^{4,5}, Gemma Navarro ^{1,3,6,*,†} and Rafael Franco ^{1,2,7,*,†}

- ¹ Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Neurodegenerativas (CiberNed), National Institute of Health Carlos III, Valderrebollo, 5, 28031 Madrid, Spain; lillojaume@gmail.com (J.L.); rivasbioq@gmail.com (R.R.-S.)
 - ² Department of Biochemistry and Molecular Biomedicine, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain
 - ³ Department of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Science, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; alilloma55@gmail.com (A.L.); dzafrasa7@alumnes.ub.edu (D.A.Z.)
 - ⁴ Basic Sciences Department, Faculty of Medicine and Health Sciences, Universitat Internacional de Catalunya, 08190 Sant Cugat del Vallès, Spain; cristina.miralpeix@inserm.fr (C.M.); ncasals@uic.es (N.C.)
 - ⁵ Centro de Investigación Biomédica en Red de Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III, Monforte de Lemos, 3, 28029 Madrid, Spain
 - ⁶ Institut de Neurociències, Universitat de Barcelona (UBNeuro), 08035 Barcelona, Spain
 - ⁷ School of Chemistry, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain
- * Correspondence: dimartts@hotmail.com (G.N.); rfranco123@gmail.com (R.F.); Tel.: +34-934021208 (R.F.)
† These authors contributed equally to this work.
‡ Equally contributed.



Citation: Lillo, J.; Lillo, A.; Zafra, D.A.; Miralpeix, C.; Rivas-Santisteban, R.; Casals, N.; Navarro, G.; Franco, R. Identification of the Ghrelin and Cannabinoid CB₂ Receptor Heteromer Functionality and Marked Upregulation in Striatal Neurons from Offspring of Mice under a High-Fat Diet. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 8928. <https://doi.org/10.3390/ijms22168928>

Academic Editor: Alessia Ligresti

Received: 1 July 2021

Accepted: 13 August 2021

Published: 19 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Abstract: Cannabinoids have been reported as orexigenic, i.e., as promoting food intake that, among others, is controlled by the so-called “hunger” hormone, ghrelin. The aim of this paper was to look for functional and/or molecular interactions between ghrelin GHSR1a and cannabinoid CB₂ receptors at the central nervous system (CNS) level. In a heterologous system we identified CB₂-GHSR1a receptor complexes with a particular heteromer print consisting of impairment of CB₂ receptor/G_i-mediated signaling. The blockade was due to allosteric interactions within the heteromeric complex as it was reverted by antagonists of the GHSR1a receptor. Cannabinoids acting on the CB₂ receptor did not affect cytosolic increases of calcium ions induced by ghrelin acting on the GHSR1a receptor. In situ proximity ligation imaging assays confirmed the expression of CB₂-GHSR1a receptor complexes in both heterologous cells and primary striatal neurons. We tested heteromer expression in neurons from offspring of high-fat-diet mouse mothers as they have more risk to be obese. Interestingly, there was a marked upregulation of those complexes in striatal neurons from siblings of pregnant female mice under a high-fat diet.

Keywords: orexigenic; anorexia; marihuana; phytocannabinoids; G protein-coupled receptors; pharmacology; receptor heteromers; signaling; high-fat diet; obesity



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The psychotropic effects of marihuana smoking led to the discovery of cannabinoid receptors and of endocannabinoids. Since the discovery of tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD) in *Cannabis sativa* L., decades of research have led to the identification of multiple phytocannabinoids that show biological activity. The characterization of cannabinoid receptors, the use of animal models of disease, and the experience of marihuana users have led to the discovery of the health-promoting benefits of natural cannabinoids. In addition to the already approved cannabinoid-containing drugs (Dronabinol/Marinol[®]-LGM Pharma Boca Raton, USA)- and Sativex[®] and Epidiolex[®]-Jazz Pharmaceuticals, Dublin, Ireland-), non-psychotropic compounds such as cannabidiol and cannabigerol

extracted from *Cannabis sativa* L. have been proposed to aid in a variety of diseases (see [1,2] for review). Although cannabinoids can act via a variety of targets (GPR55, GPCR18, peroxisome proliferator-activated receptor gamma, serotonin receptors, etc.), their canonical targets are the cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors. Both belong to the superfamily of G-protein-coupled-receptors (GPCRs) and both couple to the G_i heterotrimeric protein, i.e., receptor activation leads to G_i-mediated deactivation of adenylyl cyclase and reduction of intracellular cAMP levels. The CB₁ receptor (CB₁R), expressed mainly in neurons, is the most abundant GPCR in the nervous system; while the CB₂R is expressed at lower levels both in glia and neurons located in specific regions of the brain [3–7]. The CB₂R is considered a target for neuroprotection, especially in diseases coursing with neuroinflammation. For instance, cannabinoids acting on the CB₂R in striatal neural cells reduce the neuronal loss in synucleinopathies such as Parkinson's disease [8–13]. The underlying mechanism is mainly related to the reduction of inflammation, but the CB₂R expressed in some striatal neurons may also have a relevant role [3,7,14–16]. A selective antagonist of the CB₁R, rimonabant, approved to combat obesity was, unfortunately, withdrawn due to side effects [17–20]. The anti-obesity potential of targeting the CB₂R has not yet been addressed.

Although the molecular mechanism has not been fully elucidated, the orexigenic properties of marijuana consumption are well known [21]. Ghrelin is often considered the “hunger” hormone because its appearance in blood leads to an increase under food intake [22,23]. Ghrelin, a 28-amino acid peptide, mainly produced by specialized cells of the gastrointestinal tract, may reach the central nervous system where it activates central mechanisms that control food intake [24–27]. Its main target there is the ghrelin GHSR1a receptor, also a member of the GPCR superfamily [28]. The aim of this paper was to investigate the molecular and/or functional interactions between CB₂ and GHSR1a receptors that could explain the orexigenic effects of marijuana consumption and whether ghrelin affects the neuroprotective effects induced by cannabinoids acting on the CB₂R. As offspring from obese mothers have more risk to be obese, the potential expression of complexes formed by these two receptors was also studied in neurons isolated from fetuses of pregnant female mice in a high-fat diet.

2. Results

2.1. The CB₂R May Interact with the GHSR1a

Consumption of *Cannabis sativa* L. increases appetite via a mechanism in which ghrelin, a hormone of the endocrine system, participates. To investigate whether there may be a functional interaction between the cannabinoidergic and the orexinergic systems, we first investigated a potential interaction between the cannabinoid receptor CB₂ and the functional form of the ghrelin receptor, GHSR1a. Immunocytochemical assays in HEK-293T cells transfected with the cDNA for the CB₂R fused to the Green Fluorescent Protein (GFP²) and the cDNA of the GHSR1a fused to Renilla luciferase (RLuc) led to detect the receptors at the plasma membrane level with a marked colocalization (Figure 1A). As colocalization may be found for proteins that are close (approximately 200 nm apart) but not directly interacting, a Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) assay was performed in HEK-293T cells cotransfected with a constant amount of the cDNA for GHSR1a-RLuc and increasing amounts of cDNA for CB₂R-GFP². A saturation curve (BRET_{max}: 550 ± 50 mBU, BRET₅₀: 18 ± 4) was obtained, demonstrating a direct interaction between the two receptors in the heterologous expression system (Figure 1B). As negative control, HEK-293T cells were transfected with a constant amount of GABA_BR-RLuc cDNA and increasing amounts of GHSR1a-GFP² cDNA; the nonspecific linear signal indicated a lack of interaction between these two proteins.

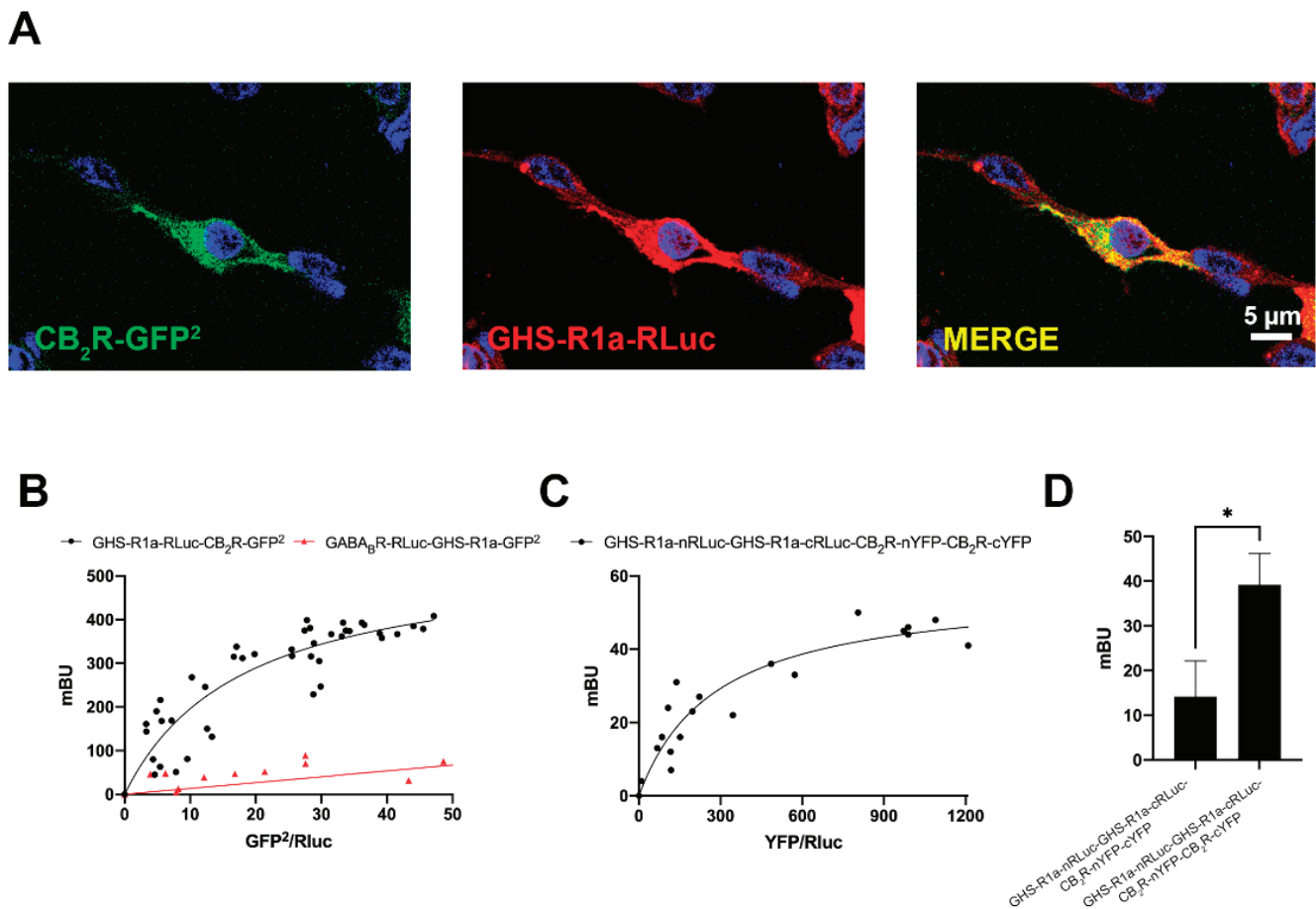


Figure 1. Molecular interaction between GHS1a and CB₂ receptors expressed in transfected HEK-293T cells. **(A)** Confocal microscopy images of HEK-293T cells co-transfected with cDNAs for GHSR1a-RLuc (0.75 µg) and for CB₂R-GFP² (0.5 µg). GHSR1a-RLuc (red) was identified by immunocytochemistry using an anti-RLuc antibody (Merck-Millipore, 1/100). The CB₂R-GFP² (green) was identified by the fluorescence due to GFP². colocalization is shown in yellow (image in the right). Cell nuclei were stained with Hoechst (blue). Scale bar: 5 µm. **(B)** BRET saturation experiments were performed using HEK-293T cells co-transfected with (i) a constant amount of GHSR1a-RLuc cDNA (1.5 µg) and increasing amounts of CB₂R-GFP² cDNA (0–2 µg) or (ii) a constant amount of GABA_B-RLuc cDNA (0.75 µg) and increasing amounts of GHSR1a-GFP² cDNA (0–2 µg) as negative control. BRET data are expressed as the mean ± SEM of 8 different experiments performed in duplicates. **(C)** Bimolecular luminescence and fluorescence complementation (BiLFC) assays were performed in HEK-293T cells co-transfected with a constant amount of GHSR1a-cRLuc and GHSR1a-nRLuc cDNAs (1.5 µg each) and increasing amounts of CB₂R-cYFP and CB₂R-nYFP cDNAs (0–3 µg each). **(D)** HEK-293T cells were co-transfected with 1.5 µg of the GHSR1a-cRLuc and GHSR1a-nRLuc cDNAs and 3 µg of the CB₂R-nYFP and CB₂R-cYFP cDNAs or with the non-fused cYFP as negative control. BRET data are expressed as the mean ± SEM of 7 different experiments performed in duplicates. * *p* < 0.05. mBU: milliBret units.

It is well known that GPCRs may form homodimers of heterodimers and higher order structures. One of the first examples has been provided for the adenosine A₁ and A_{2A} receptors that can form tetrameric structures complexed with two heterotrimeric G proteins, one G_i and one G_s [29,30]. To investigate the possible formation of tetramers formed by CB₂ and GHS1a receptors, BRET with bimolecular complementation experiments was performed in HEK-293T cells transfected with a constant amount of Rluc8 N/C hemiproteins fused to GHSR1a (GHSR1a-cRLuc and GHSR1a-nRLuc) and increasing amounts of YFP N/C hemiproteins fused to CB₂R (CB₂R-cYFP and CB₂R-nYFP). As observed in Figure 1C, both CB₂R and GHSR1a were able to reconstitute RLuc and YFP proteins, emitting, respectively, bioluminescence and fluorescence. This result proves homodimerization. However, a saturation BRET curve was possible in cells expressing a

constant amount of donor complemented hemiproteins and increasing levels of acceptor complemented hemiproteins (BRET_{max}: 56 ± 5 mBU, BRET₅₀: 280 ± 70 mBU). Taken together, these results constitute evidence of heterotetramer formation with two protomers of each receptor, i.e., a heterotetramer constituted by two homodimers. As a negative control, we obtained a negligible signal when substituting one of the fused proteins by the non-fused version (one example is provided in Figure 1D that shows data in assays where CB₂R-cYFP cDNA was substituted by that of cYFP).

2.2. CB₂R-Mediated Signaling Is Blocked in the CB₂-GHSR1a Receptor Heteromer (CB₂-GHSR1aHet)

Once a direct interaction between CB₂R and GHSR1a was identified, we investigated the functional consequences of interprotomer cross-talk within the heteromer. Signaling assays were performed taking into account that both CB₂ and GHSR1a receptors may couple to G_i. The activation of the receptors leads to reduced adenylate cyclase activity and a decrease in cytosolic cAMP levels. Accordingly, intracellular cAMP levels following receptor activation were measured in HEK-293T cells expressing CB₂R, GHSR1a or both. In cells expressing the GHSR1a, ghrelin induced a 25% decrease of forskolin-induced cAMP levels that was completely counteracted by YIL 781 (1 μM), the selective GHSR1a antagonist. Moreover, the selective CB₂R agonist, JWH-133 induced no effect, demonstrating the ligand selectivity and lack of nonspecific effects (Figure 2A). On the other hand, in cells expressing the CB₂R, 200 nM JWH-133 induced a 30% decrease with respect to forskolin-induced cAMP levels, an effect that was completely blocked by pretreatment with the selective antagonist (AM 630, 1 μM). The control that was performed with 200 nM ghrelin induced no effect (Figure 2B). In HEK-293T cells expressing both receptors, the effect of ghrelin was similar to that found in cells only expressing the ghrelin receptor (Figure 3A); remarkably, the selective CB₂R agonist, JWH-133, did not induced any effect suggesting that CB₂R, in the heteromeric context, is not functionally coupled to G_i. Simultaneous treatment with both agonists resulted in a 37% decrease of the intracellular cAMP levels, i.e., similar to levels obtained upon ghrelin treatment. However, when the same cells were pretreated with ghrelin selective antagonist (YIL 781, 1 μM) JWH-133 was able to allow the CB₂R-G_i coupling (Figure 3A). Additionally, the finding that 1 μM AM 630 in co-transfected HEK-293T cells potentiated GHSR1a-mediated signaling was also noticeable. These results indicate that (i) the basal structure restrains activation and/or decreases the functional signal, and (ii) the CB₂R blockade disappears in the presence of the selective antagonists of the partner receptor in the macromolecular complex.

We next analyzed the possibility of calcium mobilization upon activation of receptors. It is well known that GHSR1a receptor may couple to G_q, thus being linked to phospholipase C activation and calcium release from endoplasmic reticulum stores towards the cytosol. In GHSR1a-expressing HEK-293T cells, 200 nM ghrelin led to calcium mobilization (Figure 2B), that was counteracted by the pretreatment of the GHSR1a antagonist but not by the CB₂R antagonist (and did not occur in cells only expressing the CB₂R). In GHSR1a- or in CB₂-receptor-expressing cells, JWH-133 treatment did not lead to any effect (Figure 2D).

When calcium mobilization was assayed in cotransfected cells, ghrelin treatment resulted in a characteristic curve of calcium mobilization that was not significantly modified upon simultaneous treatment with JWH-133 (Figure 3B). Pretreatment with the CB₂R antagonist, AM 630, partially blocked the ghrelin effect. This phenomenon, known as cross-antagonism is, often, a print of the heteromer that is instrumental to detect it in natural sources. In these cells the CB₂R was not coupled to G_q, i.e., JWH-133 did not lead to any signal related to changes in cytosolic levels of the calcium ion.

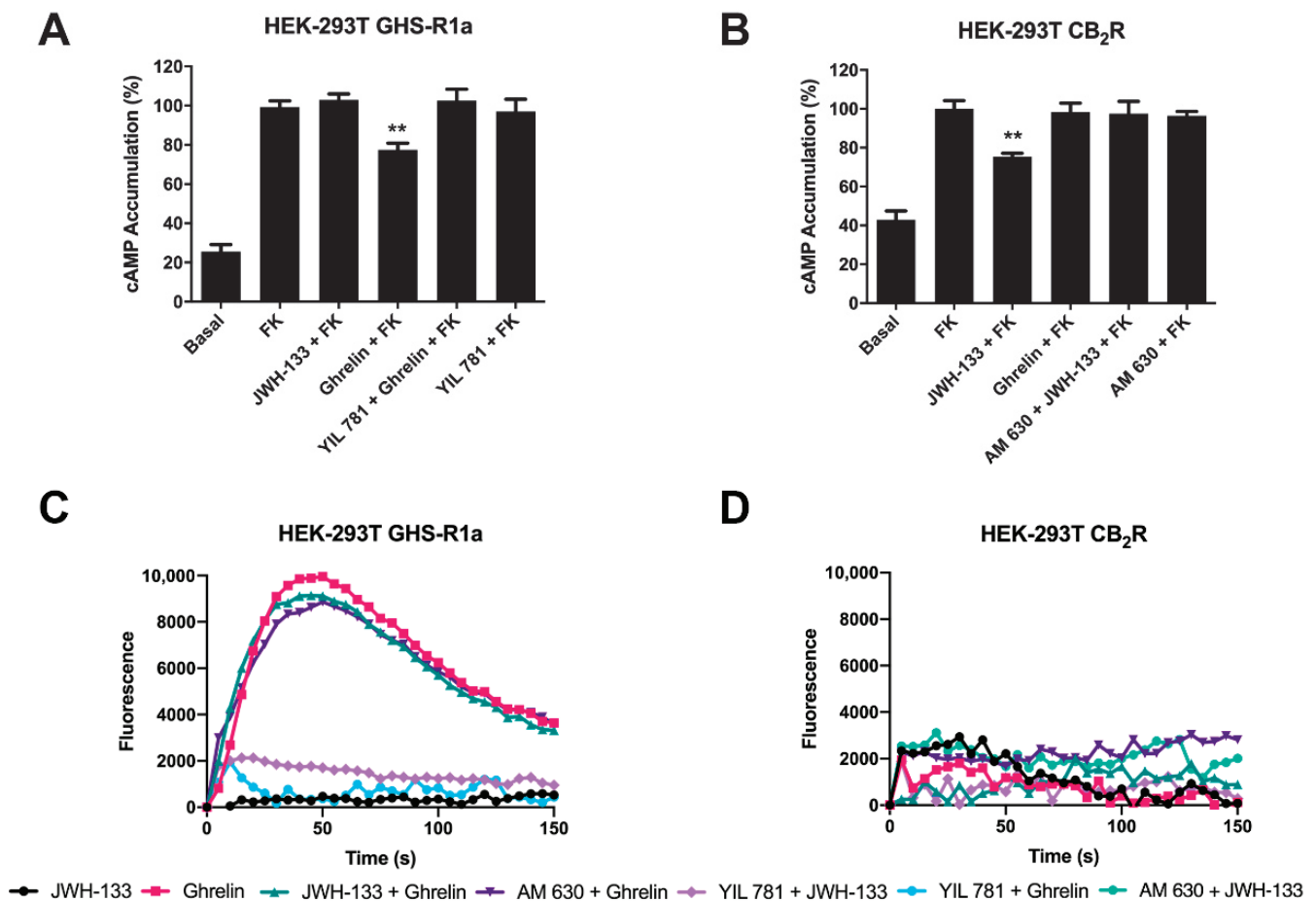


Figure 2. Functional characterization of GHS1a and CB₂ receptors expressed in HEK-293T cells. (A,B) HEK-293T cells transfected with plasmids encoding for either GHSR1a (1.5 μg) (A) or CB₂R (1 μg) (B) were pre-treated with selective antagonists, 1 μM YIL 781-GHSR1a- or 1 μM AM 630-CB₂R, and subsequently treated with the selective agonists, 200 nM ghrelin -GHSR1a- or 200 nM JWH-133 -CB₂R-. cAMP levels after 0.5 μM forskolin stimulation were detected by the Lance Ultra cAMP kit and the results were expressed in % respect to levels obtained upon forskolin stimulation. The values are the mean ± SEM of 10 different experiments performed in triplicates. One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison post-hoc test were used for statistical analysis. ** $p < 0.01$, versus forskolin treatment. (C,D) HEK-293T cells expressing an engineered calcium sensor, GCaMP6 and GHSR1a (C) or CB₂R (D) were pre-treated with selective antagonists for 10 min followed by agonist stimulation. Representative traces of intracellular Ca²⁺ responses over time are shown (6 independent experiments).

Finally, as CB₂R and GHSR1a activation leads to activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway [31,32], we tested the properties of the heteromer in the link to the MAPK signaling cascade. Hence, we measured ERK1/2 phosphorylation in HEK-293T cells expressing the two receptors. Treatment with 200 nM ghrelin resulted in a significant signal whereas 200 nM JWH-133 did not induce any effect (Figure 3C). Interestingly, pretreatment with the ghrelin receptor antagonist, YIL 781, allowed the activation of the MAPK pathway via the CB₂R. This action that results from antagonizing the GHSR1a was similar to that found in cAMP assays, i.e., blockade of the ghrelin receptor releases the brake posed on CB₂R-mediated signaling.

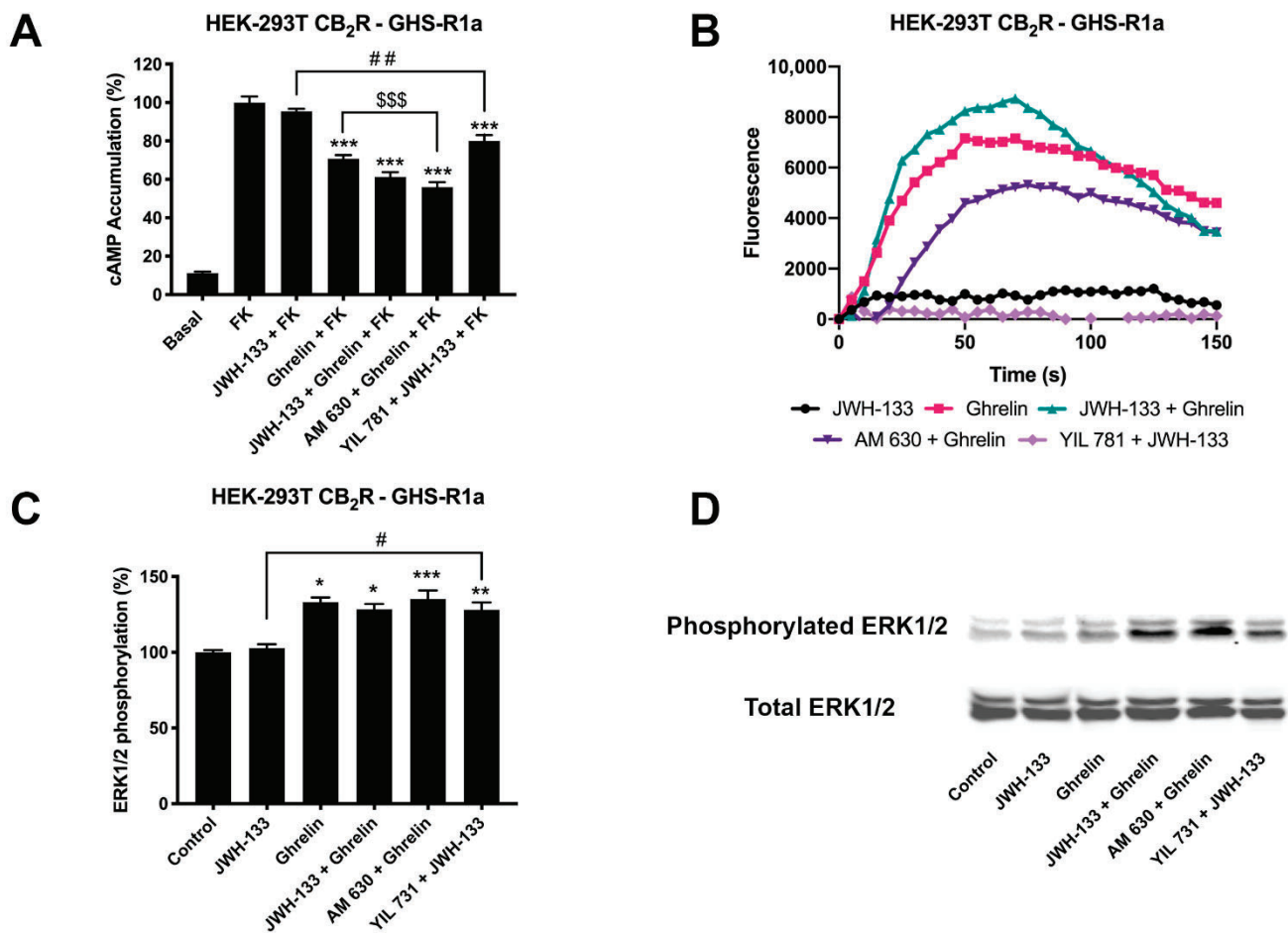


Figure 3. CB₂-GHSR1aHet-mediated signaling in transfected HEK-293T cells. Panels (A–C) HEK-293T cells were transfected with cDNAs encoding for GHSR1a (1.5 µg) and CB₂R (1 µg) (A,C) or with GHSR1a (1.5 µg), CB₂R (1 µg) and the GCaMP6 calcium sensor (B) and pre-treated with antagonists, 1 µM YIL 781 -for GHSR1a- and 1 µM AM 630 -for CB₂R, and subsequently stimulated with selective agonists, 200 nM ghrelin -for GHSR1a- and 200 nM JWH-133 -for CB₂R, individually or in combination. cAMP levels were analyzed by the Lance Ultra cAMP kit and results were expressed in % respect to levels obtained upon 0.5 µM forskolin stimulation (A). Representative traces of intracellular Ca²⁺ responses over time are shown (9 independent experiments) (B). ERK 1/2 phosphorylation was determined by immunoblot using the Odyssey infrared scanner (LI-COR Biosciences) (C,D). In cAMP accumulation and MAPK pathway signaling-related assays, the values are the mean ± SEM of 8 different experiments performed in triplicates. One-way ANOVA followed by Dunnett’s multiple comparison post-hoc test were used for statistical analysis. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, versus basal in pERK1/2 assays; *** $p < 0.001$; versus forskolin treatment in cAMP or versus basal in pERK1/2 assays, # $p < 0.05$ versus JWH-133 treatment in pERK assays, ## $p < 0.01$ versus JWH-133+FK treatment in cAMP assays; \$\$\$ $p < 0.001$; versus ghrelin+FK treatment.

2.3. CB₂R Activation Is Blocked in Striatal Neurons via Formation of Heteromers of CB₂R and GHSR1a (CB₂R-GHSR1aHets)

Upon the demonstration that CB₂R-GHSR1aHets may be formed in a heterologous system and upon the detection of particular heteromer prints, we undertook the search for detecting the prints in a more physiological context; for such purpose we used primary striatal neurons isolated from fetuses of mothers under a standard (STD) diet (see Section 4, Materials and Methods). Primary striatal neurons from fetuses of pregnant female mothers were isolated and cultured for 15 days prior to undertake signaling assays.

First, in regard to the forskolin-induced levels, the cAMP assays showed that stimulation of CB₂R with JWH-133 did not induce any significant effect (Figure 4A). These findings may be due to lack of CB₂R or to the presence of CB₂R-GHSR1aHets. However, the results using antagonists did show that the CB₂R is expressed and that is likely forming complexes

with the ghrelin receptor. In fact, YIL 781 allowed the G_i coupling of the CB_2R as JWH-133 was then able to decrease the forskolin-induced cytosolic cAMP levels (Figure 4A). These results are fully consistent with those obtained in the heterologous expression system (HEK-293T cells). In addition, analysis of the link to the MAPK pathway showed the effect of ghrelin whereas the effect of JWH-133 was only possible in cells pretreated with the selective ghrelin receptor antagonist (Figure 4B).

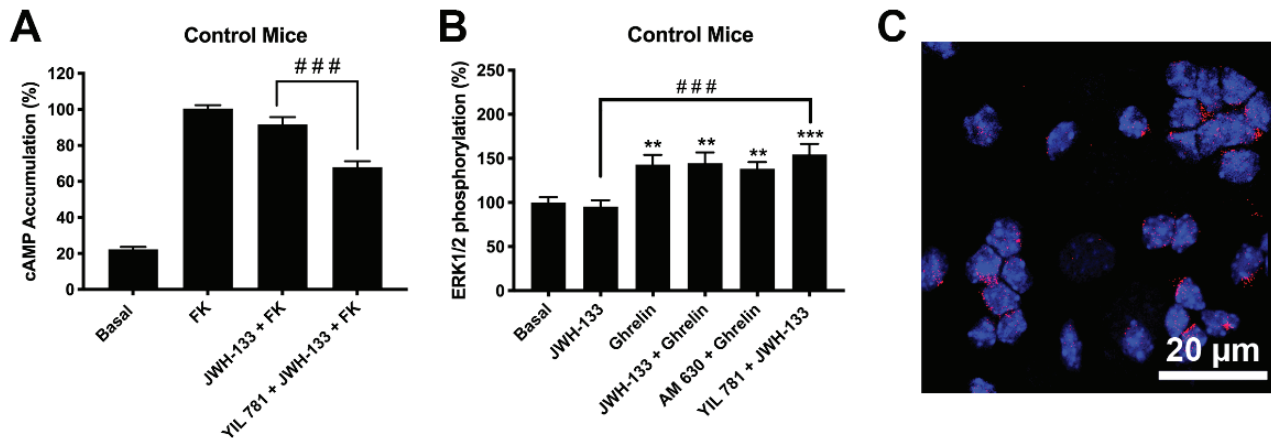


Figure 4. Expression and function of CB_2R -GHSR1aHets in primary neurons from C57BL/6J mice. (A,B) Primary striatal neurons isolated from C57BL/6J mice were pre-treated with antagonists, 1 μ M YIL 781 -for GHSR1a- or 1 μ M AM 630 -for CB_2R -, and subsequently stimulated with selective agonists, 200 nM ghrelin -for GHSR1a- or 200 nM JWH-133 -for CB_2R -, individually or in combination. cAMP levels were determined using the Lance Ultra cAMP kit and results were expressed in % respect to levels obtained upon 0.5 μ M forskolin stimulation (A), while ERK1/2 phosphorylation was analyzed using the AlphaScreen[®]SureFire[®] kit (PerkinElmer; Wellesley, MA, USA) (B). Values are the mean \pm SEM of 6 different experiments performed in triplicates. One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison post-hoc tests were used for statistical analysis. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus basal, ### $p < 0.001$; versus JWH-133+FK treatment in cAMP or versus JWH-133 treatment in p-ERK1/2 assays. (C) CB_2R -GHSR1aHets were detected in primary striatal neurons by the in situ proximity ligation assay (PLA) using specific antibodies. Cell nuclei was stained with Hoechst (blue). Samples from 5 different animals were processed and analyzed and quantitation is shown in Figure 5. Scale bar: 20 μ m.

Finally, we used an imaging technique, the Proximity Ligation Assay (PLA), to demonstrate the occurrence of CB_2R -GHSR1aHets in striatal neurons. PLA has been instrumental for detecting, in natural scenarios (cells or tissues), complexes formed by two proteins. Clusters of macromolecules formed by two different proteins appear as red dots using a confocal microscope (see Section 4, Materials and Methods for details); such red dots, which surrounded Hoechst stained nuclei, demonstrated the existence in striatal neurons of complexes of CB_2R and GHSR1a (Figure 4C).

2.4. Expression of CB_2R and GHSR1a Complexes Is Increased in Neurons of Progeny from Mothers on a High-Fat Diet

The ghrelin GHS1a receptor has an important role in controlling food intake, with some authors referring to ghrelin as the peripheral “hunger hormone” [22]. Moreover, it is known both an association between child obesity and maternal body mass index [33] and that diet-induced obesity leads to neuroinflammation and synapsis structure modification [34]. Herein, we investigated the expression of the CB_2R -GHSR1aHet in striatal neurons of the progeny from female mice under a high-fat (HFD) diet. Primary striatal neurons from fetuses of pregnant HFD mothers were isolated and cultured for 15 days prior to undertaking signaling assays, and the results were compared with those obtained from neurons isolated from fetuses of mothers under a standard diet (see results presented in the previous section).

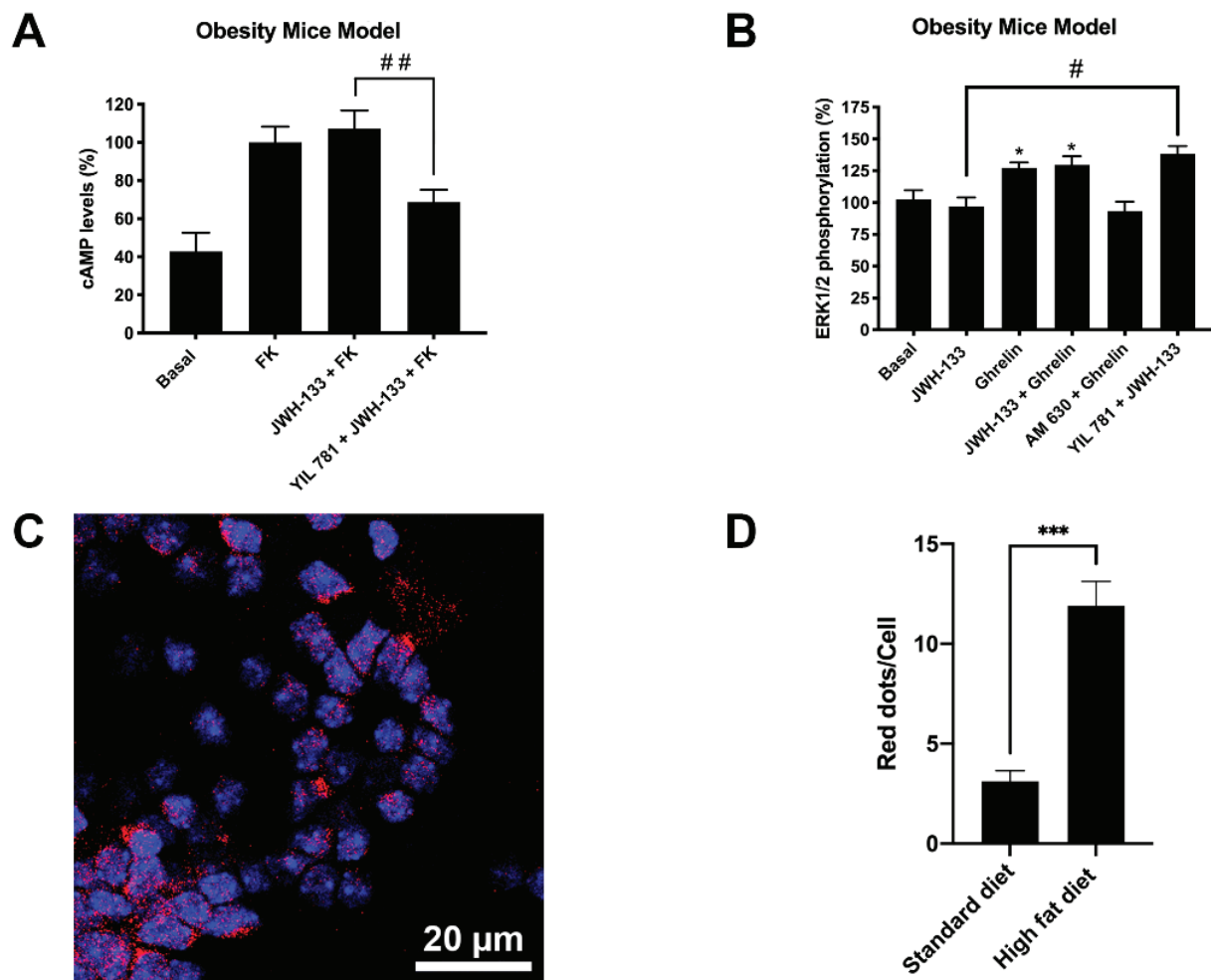


Figure 5. Expression and function of CB₂R-GHSR1aHets in primary neurons isolated from fetuses of pregnant C57BL/6J female mice subjected to a high-fat diet. (A,B) Primary striatal neurons isolated from fetuses of pregnant female mice subjected to a high-fat diet for 60 days were pre-treated with antagonists, 1 μ M YIL 781 -for GHSR1a- or 1 μ M AM 630 -for CB₂R-, followed by stimulation with selective agonists, 200 nM ghrelin -for GHSR1a- or 200 nM JWH-133 -for CB₂R-, individually or in combination. cAMP levels were determined using the Lance Ultra cAMP kit and results were expressed in % versus 0.5 μ M forskolin treatment (A) while ERK1/2 phosphorylation was analyzed using the AlphaScreen[®] SureFire[®] kit (PerkinElmer) (B). Values are the mean \pm SEM of 5 different experiments performed in triplicates. One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison post-hoc test were used for statistical analysis. # $p < 0.05$, ## $p < 0.005$ versus JWH-133+FK treatment in cAMP or versus JWH-133 treatment in p-ERK1/2 assays. * $p < 0.05$, basal. (C). CB₂R-GHSR1aHets were detected by the in situ proximity ligation assay (PLA) in primary striatal neurons; the negative control undertaken by omitting one of the primary antibodies is shown in Supplementary Figure S1. Experiments were performed in samples from 5 animals. The number of red dots/cell was quantified using the Andy's algorithm Fiji's plug-in and represented over cell stained nuclei with Hoechst (blue) (D). The number of dots-clusters/cell were compared to those in neurons from control mice (mice fed with standard diet). Unpaired t-test was used for statistics analysis. *** $p < 0.001$, versus control. Scale bar: 20 μ m.

By analyzing the cAMP levels in primary striatal neurons from mothers in a HFD (Figure 5A) the results were qualitatively similar to those observed in the control group (Figure 4A) although more marked, i.e., the decreases obtained with respect to forskolin-induced cAMP levels were higher. One print of the CB₂R-GHSR1aHet was noticed as JWH-133 was only efficacious in the presence of the selective GHS1a receptor antagonist (YIL 781). The results related to the phosphorylation of pERK1/2 (Figure 5B) were virtually identical to those found in the samples of the control group (Figure 4B), being necessary YIL 781 to observe an effect of JWH-133.

Finally, when analyzing by PLA the CB₂R-GHSR1aHet expression, a marked increase in samples from the HFD group was noticed. An average of 12 red dots per Hoechst stained nuclei were observed in neurons derived from the HFD group, whereas neurons derived from the standard diet group only presented three red dots per stained nuclei (Figures 4C and 5C,D the negative control is provided in Supplementary Figure S1). Remarkably, the striatal neurons of the siblings of HFD mothers show a much higher number of CB₂R-GHSR1aHets than neurons of the siblings of mothers in standard diet, suggesting an enhanced suppression of CB₂R function in HFD mother's siblings.

3. Discussion

There is interest in the potential of targeting cannabinoid receptors for combating a variety of diseases. Despite targeting the CB₁R was the main objective in cannabinoid-related drug discovery, the psychotropic action of some cannabinoids acting on its receptors and the side effects of a CB₁R antagonist approved to combat obesity, rimonabant, has shifted the focus toward the CB₂R. The limited expression of the CB₂R in some CNS regions and its upregulation in activated glial cells have led to propose this receptor as target to limit neuroinflammation, to limit neurotoxicity induced by oxidative stress, to afford neuroprotection and/or the increase neurogenesis/gliogenesis [11,35–41]. Medications targeting cannabinoid receptors have been approved for a very limited therapeutic interventions (Sativex[®], Marinol[®], Epidiolex[®]; mainly to combat spasticity and emesis). The potential is higher and there are clinical trials already running or in preparation to test the efficacy of cannabidiol, an allosteric modulator of the CB₂R [42], and of other cannabinoids for treating from the hypoxia of the neonate to improving the course of amyotrophic lateral or multiple sclerosis [15,43–51]. The number of registered clinical trials indicated in <https://clinicaltrials.gov/> for testing cannabidiol in a variety of pathological conditions is 321 (date: 1 July 2021). As commented in the introduction, the CB₂R is, also, an attractive target to afford neuroprotection in Parkinson's disease [3,7–14].

The ghrelin receptor expressed in the hypothalamus and in reward circuits of the brain is key to mediating the control of food intake [24,25,52–54]. Several of the known phytocannabinoids are able to enter the brain where they exert multiple actions [1,12,55–62]. This study was undertaken to identify possible interactions between the orexinergic and the cannabinoidergic systems. The discovery of complexes formed by GHS1a and CB₂ receptors and their identification in striatal neurons show that the ghrelin receptor modulates the effect of cannabinoids in the brain. From the molecular point of view our results suggest a tetrameric structure in complex with, at least, one G_i and one G_q protein. These results are qualitatively similar to those reported in the first reliable structural model of two interacting GPCRs, namely A₁ and A_{2A} adenosine receptors that arrange into a tetramer formed by two homodimers and are coupled to two different G proteins (one G_s and one G_i) [29,30]. In this example, the activation of one receptor blocks the activation of the partner receptor in the heteromer. However, the allosteric interactions within the CB₂R-GHSR1aHet are such that CB₂R-mediated signaling is blocked even in the absence of ghrelin, i.e., irrespective of the presence of the hormone, the CB₂R cannot be activated within the CB₂R-GHSR1aHet. Cannabinoid receptor activation is only possible in the presence of a selective GHS1a receptor antagonist, YIL 781. Although this atypical behavior is not found in many of the already identified GPCR heteromers (<http://www.gpcr-hetnet.com/>, accessed on 24 June 2021; [63]), it has been reported that the mere presence of the A_{2B} receptor and the formation of A_{2A}–A_{2B} receptor heteromers decreases both agonist affinity and function of the A_{2A} receptor. At present, the only reasonable hypothesis to explain the physiological role of the of CB₂R-GHSR1aHet and of A_{2A}R–A_{2B}RHet is that they are formed to suppress the functionality of one of the two receptors in the heteromer.

Heteromer formation in GPCRs appear as a means for achieving functional diversification [64–66], i.e., heteromers are functional units that behave differently than individually-expressed receptors. There have been few ghrelin receptor-containing heteromers reported in the literature. To our knowledge, GHSR1a may interact with the class A dopamine

D₁ and D₂ receptors or with class B secretin receptors [67,68]. It should be noted that cocaine interacting with sigma1-receptors modulate the GHSR1a-D₁ receptor interaction in hypothalamic cells to suppress appetite [69]. Results in the present paper show that CB₂R functionality is blunted by formation of the CB₂R-GHSR1aHet. This discovery is complemented by another result of the present study, namely that the expression of the CB₂R-GHSR1aHet in primary striatal neurons is altered in the progeny of obese mothers. The increased CB₂R-GHSR1aHets expression in samples from fetuses of mothers subjected to a HFD (when compared with samples from fetuses of mothers subjected to a STD) may explain some of the findings related to obesity and unbalanced diets. On the one hand, genetic inactivation of the gene coding for the receptor leads to improved insulin function but leads to age-related obesity [70]. On the other hand, neuroinflammation often occurs in obesity [71] and, interestingly, balancing the diet improves both maternal deficits and neuroinflammation in offspring [72]. These findings are relevant as cumulative research has found a higher proportion of obesity cases among children with obese parents [73]. Upregulation of the CB₂R-GHSR1aHet in offspring of mothers with HFD would indicate that already at birth these animals have CB₂R function compromised, i.e., the benefits of cannabinoids acting on striatal CB₂Rs would be lost by the blockade exerted by the ghrelin receptor. In addition, our results suggest that GHSR1a antagonists could have a double benefit: (i) reducing food intake and (ii) revert the detrimental effects of HFD on the functionality of striatal CB₂Rs.

4. Materials and Methods

4.1. Reagents

JWH-133, AM 630, Ghrelin and YIL 781 were purchased from Tocris Bioscience (Bristol, UK).

4.2. High Fat Diet Model Generation

C57BL/6J female mice were used for the experiments. All animals were housed on a 12 h/12 h light/ dark cycle in a temperature- and humidity-controlled room and were allowed free access to water and standard laboratory chow. C57BL/6J mice were randomly assigned to a high fat diet (HFD) (60% kcal from fat; catalog no. D12492, Research Diets, New Brunswick, NJ, USA) or standard diet (STD) (10% kcal from fat; catalog no. D12450B, Research Diets) for 60 days. Primary striatal neurons were obtained from fetuses of mother on STD or HFD. Pregnant animals were killed by cervical dislocation during the light phase. All animal procedures were performed in agreement with European guidelines (2010/63/EU) and approved by the University of Barcelona Ethical Committee, which reports to the regional Government (Protocol #9659; Generalitat de Catalunya, 24 May 2019).

4.3. Cell Culture and Transient Transfection

Human embryonic Kidney HEK-293T (lot 612968) cells were acquired from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). They were amplified and frozen in liquid nitrogen in several aliquots. Cells from each aliquot were used until passage 19. HEK-293T cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco, Waltham, MA, USA) supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin/streptomycin, MEM Non-Essential Amino Acid Solution (1/100) and 5% (*v/v*) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (all supplements were from Invitrogen, Paisley, Scotland, UK) and maintained in a humid atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C.

Cells were transiently transfected with the corresponding cDNAs using the PEI (Poly EthylenImine, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) method as previously described [74,75]. 4 h after transfection, growth medium was replaced by complete medium. Experiments were carried out 48 h later.

To prepare primary striatal neurons, brains from fetuses of pregnant C57/BL6 mice were removed (gestational age: 17 days). Neurons were isolated as described in Hrad-

sky et al. [1] and plated at a confluence of 40,000 cells/0.32 cm². Briefly, the samples were dissected and, after careful removal of the meninges, digested for 20 min at 37 °C with 0.25% trypsin. Trypsinization was stopped by adding an equal volume of culture medium (Dulbecco's modified Eagle medium-F-12 nutrient mixture, Invitrogen). Cells were brought to a single cell suspension by repeated pipetting followed by passage through a 100 µm-pore mesh. Pelleted (7 min, 200× g) cells were resuspended in supplemented DMEM and seeded at a density of 3.5 × 10⁵ cells/mL in 6-well plates. The day after, medium was replaced by neurobasal medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin/streptomycin and 2% (v/v) B27 medium (GIBCO). Neuronal cultures were used for assays after 15 days of culture. Using NeuN as a marker, the percentage of neurons in the cultures was >90%.

4.4. Expression Vectors

The human cDNAs for the CB₂, GHS1a and GABA_B receptors cloned in pcDNA3.1 were amplified without their stop codons using sense and antisense primers. The primers harbored either unique BamHI and HindIII sites for GHS1a and GABA_B receptors and BamHI and KpnI sites for the CB₂R. The fragments were subcloned to be in frame with an enhanced green fluorescent protein (GFP²-N2, Clontech, Heidelberg, Germany), the Renilla luciferase protein (RLuc) (pRLuc-N1; PerkinElmer, Wellesley, MA, USA) or the hemiproteins nRLuc8, cRLuc8, nVenus or cVenus (pcDNA3.1-nRLuc8, pcDNA3.1-cRLuc8, pcDNA3.1-nVenus and pcDNA3.1-cVenus) on the C-terminal end of the receptor to produce CB₂R-GFP², GHSR1a-GFP², GHSR1a-RLuc, GABA_BR-RLuc, GHSR1a-nRLuc, GHSR1a-cRLuc, CB₂R-nYFP and CB₂R-cYFP fusion proteins.

4.5. Immunofluorescence

HEK-293T cells transfected with cDNAs for CB₂R-GFP² and GHSR1a-RLuc were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min and then washed twice with PBS containing 20 mM glycine before permeabilization with the same buffer containing 0.2% Triton X-100 (5 min incubation). The samples were treated for 1 h with blocking solution (PBS containing 1% bovine serum albumin) and labeled with a mouse anti-RLuc (1/100; MAB4400, Millipore, Burlington, MA, USA) as primary antibody and a Cy3-conjugated anti-mouse IgG (1/200; 715-166-150; Jackson ImmunoResearch) as secondary antibody. The samples were washed several times and mounted with 30% Mowiol (Calbiochem, San Diego, CA, USA). Nuclei were stained with Hoechst (1/100). Samples were observed under a Zeiss 880 confocal microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

4.6. Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) Assay

HEK-293T cells growing in 6-well plates were transiently co-transfected with a constant amount of cDNA encoding for GHSR1a-Rluc and with increasing amounts of cDNA for CB₂R-GFP². For negative control, cells were co-transfected with a constant amount of cDNA encoding for GABA_BR-Rluc and with increasing amounts of cDNA for GHSR1a-GFP². 48 h post-transfection, cells were washed twice in quick succession with HBSS (137 mM NaCl; 5 mM KCl; 0.34 mM Na₂HPO₄; 0.44 mM KH₂PO₄; 1.26 mM CaCl₂; 0.4 mM MgSO₄; 0.5 mM MgCl₂ and 10 mM HEPES, pH 7.4) supplemented with 0.1% glucose (w/v), detached by gently pipetting and resuspended in the same buffer. To have an estimation of the number of cells per plate, protein concentration was determined using a Bradford assay kit (Bio-Rad, Munich, Germany) using bovine serum albumin dilutions for standardization. To quantify GFP²-fluorescence expression, cells were distributed (20 µg protein) in 96-well microplates (black plates with a transparent bottom; Porvair, Leatherhead, UK). Fluorescence was read using a fluorimeter FluoStar Optima (BMG Labtechnologies, Offenburg, Germany) equipped with a high-energy xenon flash lamp, reading at 510 nm. GFP²-fluorescence expression was determined as the fluorescence of the sample minus the fluorescence of cells only expressing protein-RLuc. For the BRET² measurements, the equivalent of 20 µg protein of cell suspension was distributed in 96-well

microplates (white plates; Porvair), and 5 μM Deep-Blue C was added (PJK GMBH, Kleinblittersdorf, Germany). 30 s after, readings were collected using a Mithras LB 940 (Berthold, Bad Wildbad, Germany), which allowed the integration of the signals detected in the short-wavelength filter at 410 nm (400–420 nm) and the long-wavelength filter at 510 nm (500–520 nm). To quantify receptor-RLuc expression, luminescence readings were collected 10 min after 5 μM coelenterazine H addition. The net BRET is defined as [(long-wavelength emission)/(short-wavelength emission)]-Cf where Cf corresponds to [(long-wavelength emission)/(short-wavelength emission)] for the RLuc construct expressed alone in the same experiment. The BRET curves were fitted assuming a single phase by a non-linear regression equation using the GraphPad Prism software (San Diego, CA, USA). BRET values are given as milli BRET units (mBU: 1000 \times net BRET).

4.7. BRET with Bimolecular Luminescence and Fluorescence Complementation (BiLFC)

For BRET with bimolecular luminescence and fluorescence complementation (BiLFC) assays, HEK-293T cells were transiently transfected with a constant amount of cDNAs for GHSR1a-cRLuc and for GHSR1a-nRLuc cDNAs and increasing amounts of cDNAs for CB₂R-cYFP and for CB₂R-nYFP cDNAs. For negative controls, the cDNA for one of the fusion proteins was substituted by the corresponding empty vector (pcDNA3.1-cYFP) maintaining the other three plasmids. Protein determination was performed as described in the previous section. 48 h post-transfection, the equivalent of 20 μg protein of cell suspension was distributed in 96-well microplates. To quantify protein-YFP expression, fluorescence was read in a Mithras LB 940 equipped with a high-energy xenon flash lamp, using a 30 nm bandwidth excitation filter at 485 nm and an emission filter at 530 nm (510–550 nm). For BRET measurements, readings were collected 1 min after the addition of 5 μM coelenterazine H (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) using a Mithras LB 940, which allows the integration of the signals detected in the short-wavelength filter at 485 nm and the long-wavelength filter at 530 nm. To quantify protein-RLuc expression, luminescence readings were obtained 10 min after 5 μM coelenterazine H addition using a Mithras LB 940.

4.8. cAMP Determination

HEK-293T cells transfected with the cDNAs for CB₂R (0.5 μg) and/or GHSR1a (1 μg) and neuronal primary cultures were plated in 6 well plates. Two hours before initiating the experiment, neuronal culture or HEK-293T cell-culture media were exchanged to non-supplemented DMEM medium. Then, cells were detached, re-suspended in non-supplemented medium containing 50 μM zardaverine, and plated in 384-well microplates (2500 cells/well). Cells were pretreated (15 min) with the corresponding antagonists (1 μM AM 630 for CB₂R or 1 μM YIL 781 for GHSR1a) or vehicle and stimulated with agonists (200 nM JWH-133 for CB₂R or 200 nM ghrelin for GHSR1a) (15 min) before the addition of 0.5 μM forskolin or vehicle. Finally, reaction was stopped by addition of the Eu-cAMP tracer and the ULight-cAMP monoclonal antibody prepared in the “cAMP detection buffer” (PerkinElmer). All steps were performed at 25°. Homogeneous time-resolved fluorescence energy transfer (HTRF) measures were performed after 60 min incubation using the Lance Ultra cAMP kit (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Fluorescence at 665 nm was analyzed on a PHERAstar Flagship microplate reader equipped with an HTRF optical module (BMG Lab technologies, Offenburg, Germany).

4.9. MAPK Phosphorylation Assays

To determine MAP kinase 1/2 (ERK1/2) phosphorylation, striatal neurons were plated in transparent Deltalab 96-well plates and kept in the incubator for 15 days. 2 to 4 h before the experiment, the medium was replaced by serum starved medium. Next, the cells were pre-treated at 25 °C for 10 min with antagonists (1 μM AM 630 for CB₂R or 1 μM YIL 781 for GHSR1a) or vehicle and stimulated for an additional 7 min with selective agonists (200 nM JWH-133 for CB₂R or 200 nM ghrelin for GHSR1a). Then, neurons were washed twice

with cold PBS before the addition of 30 μL /well “Ultra lysis buffer” -PerkinElmer- (20 min treatment). Afterwards, 10 μL of each supernatant were placed in white ProxiPlate 384-well plates and ERK1/2 phosphorylation was determined using an AlphaScreen[®] SureFire[®] kit (PerkinElmer), following the instructions of the supplier, and using an EnSpire[®] Multimode Plate Reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). The reference value (100%) was the value achieved in the absence of any treatment (basal). The ligands effect was given in percentage with respect to the basal value.

On the other hand, HEK-293T cells were cultured into 25 cm^2 flasks and transfected with the cDNAs for CB₂R (0.5 μg) and/or GHSR1a (1 μg). Two hours before initiating the experiment, cell-culture medium was exchanged to serum-starved DMEM medium. The cells were, subsequently, pre-treated at 25 °C for 10 min with antagonists (1 μM AM 630 for CB₂R or 1 μM YIL 781 for GHSR1a) or vehicle and stimulated for an additional 7 min with selective agonists (200 nM JWH-133 for CB₂R or 200 nM ghrelin for GHSR1a). Stimulation was ended by a rapid rinse with ice-cold PBS, and the cell lysis was performed by the addition of 250 μL of ice-cold lysis buffer. Cellular debris were removed by centrifugation at 13,000 $\times g$ for 5 min at 4 °C, and protein was quantified by the bicinchoninic acid method using bovine serum albumin dilutions as standard. To determine the level of ERK1/2 phosphorylation, equivalent amounts of protein (10 μg) were separated by electrophoresis on a denaturing 10% SDS-polyacrylamide gel and transferred onto PVDF-FL membranes. Membranes were blocked with Odyssey blocking buffer (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) for 60 min and probed with a mixture of a mouse anti-phospho-ERK1/2 antibody (1:2500, Sigma-Aldrich) and rabbit anti-ERK1/2 antibody (1:40,000, Sigma-Aldrich) for 2 h. The 42 and 44 kDa bands corresponding to ERK 1 and ERK 2 were visualized by the addition of a mixture of IRDye 800 (anti-mouse) antibody (1:10,000, Sigma-Aldrich) and IRDye 680 (anti-rabbit) antibody (1:10,000, Sigma-Aldrich) for 1 h and scanned by the Odyssey infrared scanner (LI-COR Biosciences). Band densities were quantified using the scanner software and exported to Microsoft Excel. The level of phosphorylated ERK 1/2 was normalized for differences in loading using the total ERK1/2 protein band intensities.

4.10. Intracellular Calcium Mobilization

HEK-293T cells were co-transfected with cDNAs for CB₂R (0.5 μg) and/or GHSR1a (1 μg) in the presence of 1 μg cDNA for the calmodulin-based calcium GCaMP6 sensor. Forty-eight hours after transfection, cells were detached using Mg²⁺-free Locke's buffer pH 7.4 (154 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 3.6 mM NaHCO₃, 2.3 mM CaCl₂, 5.6 mM glucose and 5 mM HEPES) supplemented with 10 μM glycine. 1500 cells per well were plated in 96-well black, clear bottom, microtiter plates. Then, cells were incubated for 10 min with the CB₂R and GHSR1a antagonists (1 μM AM 630 or 1 μM YIL 781), and subsequently stimulated with selective agonists (200 nM JWH-133 or 200 nM ghrelin). Upon excitation at 488 nm, real-time 515 nm fluorescence emission due to calcium-ion complexed GCaMP6 was recorded on the EnSpire[®] Multimode Plate Reader (every 5 s, 100 flashes per well).

4.11. Proximity Ligation Assays (PLAs)

Physical interaction between CB₂R and GHSR1a were detected using the Duolink in situ PLA detection Kit (OLink; Bioscience, Uppsala, Sweden) following the instructions of the supplier. Primary neurons were grown on glass coverslips, fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min, washed with PBS containing 20 mM glycine to quench the aldehyde groups and permeabilized with the same buffer containing 0.05% Triton X-100 (20 min). Then, samples were extensively washed with PBS. After 1 h incubation at 37 °C with the blocking solution in a pre-heated humidity chamber, primary cultures were incubated overnight in the antibody diluent medium with a mixture of equal amounts of mouse anti-CB₂R (1/100; sc-293188, Santa Cruz Technologies, Dallas, TX, USA) and rabbit anti-GHSR1a (1/100; ab95250, Abcam, Cambridge, United Kingdom) to detect CB₂R–GHSR1a complexes. Neurons were processed using the PLA probes detecting primary antibodies (Duolink II PLA probe plus and Duolink II PLA probe minus) diluted in the antibody

diluent solution (1:5). Ligation and amplification were done as indicated by the supplier. Samples were mounted using the mounting medium with Hoechst (1/100; Sigma-Aldrich) to stain nuclei. Samples were observed in a Leica SP2 confocal microscope (Leica Microsystems, Mannheim, Germany) equipped with an apochromatic 63× oil immersion objective (N.A. 1.4) and 405 and a 561 nm laser lines. For each field of view, a stack of two channels (one per staining) and four Z stacks with a step size of 1 µm were acquired. The number of neurons containing one or more red spots versus total cells (blue nucleus) was determined, and the unpaired Student's t-test was used to compare the values (red dots/cell) obtained in the two groups.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms22168928/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, G.N. and R.F.; Data Curation, R.F.; Formal Analysis, J.L., A.L. and G.N.; Investigation, J.L., A.L., D.A.Z., C.M. and G.N.; Methodology, J.L., A.L. and R.R.-S.; Project Administration, R.R.-S.; Resources, C.M., N.C., G.N. and R.F.; Software, R.R.-S.; Supervision, G.N. and R.F.; Validation, G.N.; Writing—Original Draft, G.N. and R.F.; Writing—Review and Editing, J.L., A.L., C.M., R.R.-S., N.C. and G.N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was partially supported by the AARFD-17-503612 grant the US Alzheimer's Association, and by grants SAF2017-84117-R and PID2020-113430RB-I00 from the Spanish Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (MCIU; or equivalent) and Spanish Agencia Estatal de Investigación (AEI); they include UE FEDER funds.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Ethics Committee (Protocol #9659; Generalitat de Catalunya).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are available upon reasonable request to corresponding authors. A Western blot compilation file accompanies the submission and may be found via IJMS.

Acknowledgments: In memoriam, María Teresa Miras-Portugal a great scientist and a beloved friend of R.F.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Franco, R.; Rivas-Santisteban, R.; Reyes-Resina, I.; Casanovas, M.; Pérez-Olives, C.; Ferreiro-Vera, C.; Navarro, G.; Sánchez de Medina, V.; Nadal, X. Pharmacological potential of varinic-, minor-, and acidic phytocannabinoids. *Pharmacol. Res.* **2020**, *158*, 104801. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Gonçalves, E.; Baldasso, G.; Bicca, M.; Paes, R.; Capasso, R.; Dutra, R. Terpenoids, Cannabimimetic Ligands, beyond the Cannabis Plant. *Molecules* **2020**, *25*, 1567. [[CrossRef](#)]
3. Lanciego, J.L.; Barroso-Chinea, P.; Rico, A.J.; Conte-Perales, L.; Callén, L.; Roda, E.; Gómez-Bautista, V.; López, I.P.; Lluís, C.; Labandeira-García, J.L.; et al. Expression of the mRNA coding the cannabinoid receptor 2 in the pallidal complex of *Macaca fascicularis*. *J. Psychopharmacol.* **2011**, *25*, 97–104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Sierra, S.; Luquin, N.; Rico, A.J.; Gómez-Bautista, V.; Roda, E.; Dopeso-Reyes, I.G.; Vázquez, A.; Martínez-Pinilla, E.; Labandeira-García, J.L.; Franco, R.; 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*, 2721–2738. [[CrossRef](#)]
5. Reyes-Resina, I.; Navarro, G.; Aguinaga, D.; Canela, E.I.; Schoeder, C.T.; Załuski, M.; Kieć-Kononowicz, K.; Saura, C.A.; Müller, C.E.; Franco, R. Molecular and functional interaction between GPR18 and cannabinoid CB2 G-protein-coupled receptors. Relevance in neurodegenerative diseases. *Biochem. Pharmacol.* **2018**, *157*, 169–179. [[CrossRef](#)]
6. García-Gutiérrez, M.S.; Navarrete, F.; Navarro, G.; Reyes-Resina, I.; Franco, R.; Lanciego, J.L.; Giner, S.; Manzanares, J. Alterations in gene and protein expression of cannabinoid cb2 and gpr55 receptors in the dorsolateral prefrontal cortex of suicide victims. *Neurotherapeutics* **2018**, *15*, 796–806. [[CrossRef](#)]
7. Navarro, G.; Borroto-Escuela, D.; Angelats, E.; Etayo, I.; Reyes-Resina, I.; Pulido-Salgado, M.; Rodríguez-Pérez, A.; Canela, E.; Saura, J.; Lanciego, J.L.; et al. Receptor-heteromer mediated regulation of endocannabinoid signaling in activated microglia. Role

- of CB1 and CB2 receptors and relevance for Alzheimer's disease and levodopa-induced dyskinesia. *Brain. Behav. Immun.* **2018**, *67*, 139–151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Rentsch, P.; Stayte, S.; Egan, T.; Clark, I.; Vissel, B. Targeting the cannabinoid receptor CB2 in a mouse model of l-dopa induced dyskinesia. *Neurobiol. Dis.* **2020**, *134*, 104646. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 9. Antonazzo, M.; Botta, M.; Bengoetxea, H.; Ruiz-Ortega, J.Á.; Morera-Herreras, T. Therapeutic potential of cannabinoids as neuroprotective agents for damaged cells conducing to movement disorders. In *International Review of Neurobiology*; Academic Press Inc.: Cambridge, MA, USA, 2019; Volume 146, pp. 229–257.
 10. He, X.; Yang, L.; Huang, R.; Lin, L.; Shen, Y.; Cheng, L.; Jin, L.; Wang, S.; Zhu, R. Activation of CB2R with AM1241 ameliorates neurodegeneration via the Xist/miR-133b-3p/Pitx3 axis. *J. Cell. Physiol.* **2020**, *235*, 6032–6042. [[CrossRef](#)]
 11. 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*, 406. [[CrossRef](#)]
 12. Palomo-Garo, C.; Gómez-Gálvez, Y.; García, C.; Fernández-Ruiz, J. Targeting the cannabinoid CB 2 receptor to attenuate the progression of motor deficits in LRRK2-transgenic mice. *Pharmacol. Res.* **2016**, *110*, 181–192. [[CrossRef](#)]
 13. Fernández-Ruiz, J.; Romero, J.; Ramos, J. Endocannabinoids and neurodegenerative disorders: Parkinson's disease, Huntington's chorea, Alzheimer's disease, and others. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2015**, *231*, 233–259.
 14. Gómez-Gálvez, Y.; Palomo-Garo, C.; Fernández-Ruiz, J.; García, C. Potential of the cannabinoid CB2 receptor as a pharmacological target against inflammation in Parkinson's disease. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2016**, *64*, 200–208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 15. Franco, R.; Villa, M.; Morales, P.; Reyes-Resina, I.; Gutiérrez-Rodríguez, A.; Jiménez, J.; Jagerovic, N.; Martínez-Orgado, J.; Navarro, G. Increased expression of cannabinoid CB2 and serotonin 5-HT1A heteroreceptor complexes in a model of newborn hypoxic-ischemic brain damage. *Neuropharmacology* **2019**, *152*, 58–66. [[CrossRef](#)]
 16. Song, W.M.; Colonna, M. The identity and function of microglia in neurodegeneration. *Nat. Immunol.* **2018**, *19*, 1048–1058. [[CrossRef](#)]
 17. Christensen, R.; Kristensen, P.K.; Bartels, E.M.; Bliddal, H.; Astrup, A. Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: A meta-analysis of randomised trials. *Lancet* **2007**, *370*, 1706–1713. [[CrossRef](#)]
 18. Carai, M.A.M.; Colombo, G.; Maccioni, P.; Gessa, G.L. Efficacy of rimonabant and other cannabinoid CB1 receptor antagonists in reducing food intake and body weight: Preclinical and clinical data. *CNS Drug Rev.* **2006**, *12*, 91–99. [[CrossRef](#)]
 19. Christensen, R.; Kristensen, P.K.; Bartels, E.M.; Bliddal, H.; Astrup, A.V. A meta-analysis of the efficacy and safety of the anti-obesity agent Rimonabant. *Ugeskr. Laeger* **2007**, *169*, 4360–4363.
 20. Sam, A.H.; Salem, V.; Ghatei, M.A. Rimonabant: From RIO to Ban. *J. Obes.* **2011**, *2011*, 432607. [[CrossRef](#)]
 21. Pagotto, U.; Cervino, C.; Vicennati, V.; Marsicano, G.; Lutz, B.; Pasquali, R. How many sites of action for endocannabinoids to control energy metabolism? *Int. J. Obes.* **2006**, *30*, S39–S43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 22. Higgins, S.C.; Gueorguiev, M.; Korbonits, M. Ghrelin, the peripheral hunger hormone. *Ann. Med.* **2007**, *39*, 116–136. [[CrossRef](#)]
 23. Pradhan, G.; Samson, S.L.; Sun, Y. Ghrelin: Much more than a hunger hormone. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **2013**, *16*, 619–624. [[CrossRef](#)]
 24. Cassidy, R.M.; Tong, Q. Hunger and satiety gauge reward sensitivity. *Front. Endocrinol.* **2017**, *8*, 104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 25. Funahashi, H.; Takenoya, F.; Guan, J.-L.; Kageyama, H.; Yada, T.; Shioda, S. Hypothalamic neuronal networks and feeding-related peptides involved in the regulation of feeding. *Anat. Sci. Int. Jpn. Assoc. Anat.* **2003**, *78*, 123–138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 26. Abizaid, A.; Horvath, T.L. Brain circuits regulating energy homeostasis. *Regul. Pept.* **2008**, *149*, 3–10. [[CrossRef](#)]
 27. Schellekens, H.; Dinan, T.G.; Cryan, J.F. Lean mean fat reducing “ghrelin” machine: Hypothalamic ghrelin and ghrelin receptors as therapeutic targets in obesity. *Neuropharmacology* **2010**, *58*, 2–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 28. Alexander, S.P.; Christopoulos, A.; Davenport, A.P.; Kelly, E.; Mathie, A.; Peters, J.A.; Veale, E.L.; Armstrong, J.F.; Faccenda, E.; Harding, S.D.; et al. The concise guide to pharmacology 2019/20: G protein-coupled receptors. *Br. J. Pharmacol.* **2019**, *176*, S21–S141. [[CrossRef](#)]
 29. Navarro, G.; Cordero, A.; Brugarolas, M.; Moreno, E.; Aguinaga, D.; Pérez-Benito, L.; Ferre, S.; Cortés, A.; Casadó, V.; Mallol, J.; et al. Cross-communication between Gi and Gs in a G-protein-coupled receptor heterotetramer guided by a receptor C-terminal domain. *BMC Biol.* **2018**, *16*, 24. [[CrossRef](#)]
 30. Navarro, G.; Cordero, A.; Zelman-Femiak, M.; Brugarolas, M.; Moreno, E.; Aguinaga, D.; Perez-Benito, L.; Cortés, A.; Casadó, V.; Mallol, J.; et al. Quaternary structure of a G-protein-coupled receptor heterotetramer in complex with Gi and Gs. *BMC Biol.* **2016**, *14*, 26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 31. Navarro, G.; Reyes-Resina, I.; Rivas-Santisteban, R.; Sánchez de Medina, V.; Morales, P.; Casano, S.; Ferreiro-Vera, C.; Lillo, A.; Aguinaga, D.; Jagerovic, N.; et al. Cannabidiol skews biased agonism at cannabinoid CB1 and CB2 receptors with smaller effect in CB1-CB2 heteroreceptor complexes. *Biochem. Pharmacol.* **2018**, *157*, 148–158. [[CrossRef](#)]
 32. Mousseaux, D.; Le Gallic, L.; Ryan, J.; Oiry, C.; Gagne, D.; Fehrentz, J.-A.; Galleyrand, J.-C.; Martinez, J. Regulation of ERK1/2 activity by ghrelin-activated growth hormone secretagogue receptor 1A involves a PLC/PKC ϵ pathway. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *148*, 350–365. [[CrossRef](#)]
 33. Heslehurst, H.; Vieira, R.; Akhter, Z.; Bailey, H.; Slack, E.; Ngongalah, L.; Pemu, A.; Rankin, J. The association between maternal body mass index and child obesity: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Med.* **2019**, *16*, e1002817. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

34. Guillemot-Legrís, O.; Muccioli, G.G. Obesity-induced neuroinflammation: Beyond the hypothalamus. *Trends Neurosci.* **2017**, *40*, 237–253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Mecha, M.; Feliú, A.; Carrillo-Salinas, F.J.; Rueda-Zubiaurre, A.; Ortega-Gutiérrez, S.; de Sola, R.G.; Guaza, C. Endocannabinoids drive the acquisition of an alternative phenotype in microglia. *Brain. Behav. Immun.* **2015**, *49*, 233–245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Cottone, E.; Pomatto, V.; Rapelli, S.; Scandiffio, R.; Mackie, K.; Bovolin, P. Cannabinoid receptor modulation of neurogenesis: ST14A striatal neural progenitor cells as a simplified in vitro model. *Molecules* **2021**, *26*, 1448. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Cassano, T.; Calcagnini, S.; Pace, L.; De Marco, F.; Romano, A.; Gaetani, S. Cannabinoid receptor 2 signaling in neurodegenerative disorders: From pathogenesis to a promising therapeutic target. *Front. Neurosci.* **2017**, *11*, 30. [[CrossRef](#)]
38. García-Ovejero, D.; Arévalo-Martín, A.; Navarro-Galve, B.; Pinteaux, E.; Molina-Holgado, E.; Molina-Holgado, F. Neuroimmune interactions of cannabinoids in neurogenesis: Focus on interleukin-1 β (IL-1 β) signalling. *Biochem. Soc. Trans.* **2013**, *41*, 1577–1582. [[CrossRef](#)]
39. Komorowska-Müller, J.A.; Schmöle, A.C. CB2 receptor in microglia: The guardian of self-control. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 19. [[CrossRef](#)]
40. Docagne, F.; Mestre, L.; Loria, F.; Hernangómez, M.; Correa, F.; Guaza, C. Therapeutic potential of CB2 targeting in multiple sclerosis. *Expert Opin. Ther. Targets* **2008**, *12*, 185–195. [[CrossRef](#)]
41. Ilyasov, A.A.; Milligan, C.E.; Pharr, E.P.; Howlett, A.C. The endocannabinoid system and oligodendrocytes in health and disease. *Front. Neurosci.* **2018**, *12*, 733. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Martínez-Pinilla, E.; Varani, K.; Reyes-Resina, I.; Angelats, E.; Vincenzi, F.; Ferreira-Vera, C.; Oyarzabal, J.; Canela, E.I.; Lanciego, J.L.; Nadal, X.; et al. Binding and signaling studies disclose a potential allosteric site for cannabidiol in cannabinoid CB2 receptors. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, 744. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Ceprián, M.; Jiménez-Sánchez, L.; Vargas, C.; Barata, L.; Hind, W.; Martínez-Orgado, J. Cannabidiol reduces brain damage and improves functional recovery in a neonatal rat model of arterial ischemic stroke. *Neuropharmacology* **2017**, *116*, 151–159. [[CrossRef](#)]
44. Mohammed, N.; Ceprian, M.; Jimenez, L.; Pazos, M.R.; Martinez-Orgado, J. Neuroprotective effects of cannabidiol in hypoxic ischemic insult: The therapeutic window in newborn mice. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* **2016**, *27*, 27. [[CrossRef](#)]
45. Garberg, H.T.; Huun, M.U.; Escobar, J.; Martinez-Orgado, J.; Løberg, E.M.; Solberg, R.; Saugstad, O.D. Short-term effects of cannabidiol after global hypoxia-ischemia in newborn piglets. *Pediatr. Res.* **2016**, *80*, 710–718. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. De Lago, E.; Fernández-Ruiz, J. Cannabinoids and neuroprotection in motor-related disorders. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* **2007**, *6*, 377–387. [[CrossRef](#)]
47. Molina-Holgado, E.; Vela, J.M.; Arévalo-Martín, A.; Almazán, G.; Molina-Holgado, F.; Borrell, J.; Guaza, C. Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: Involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling. *J. Neurosci.* **2002**, *22*, 9742–9753. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Carrillo-Salinas, F.J.; Mestre, L.; Mecha, M.; Feliú, A.; Del Campo, R.; Villarrubia, N.; Espejo, C.; Montalbán, X.; Álvarez-Cermeño, J.C.; Villar, L.M.; et al. Gut dysbiosis and neuroimmune responses to brain infection with Theiler’s murine encephalomyelitis virus. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 44377. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Mecha, M.; Yanguas-Casás, N.; Feliú, A.; Mestre, L.; Carrillo-Salinas, F.; Azcoitia, I.; Yong, V.W.; Guaza, C. The endocannabinoid 2-AG enhances spontaneous remyelination by targeting microglia. *Brain. Behav. Immun.* **2019**, *77*, 110–126. [[CrossRef](#)]
50. Mecha, M.; Carrillo-Salinas, F.J.; Feliú, A.; Mestre, L.; Guaza, C. Microglia activation states and cannabinoid system: Therapeutic implications. *Pharmacol. Ther.* **2016**, *166*, 40–55. [[CrossRef](#)]
51. Correa, F.; Docagne, F.; Mestre, L.; Loria, F.; Hernangómez, M.; Borrell, J.; Guaza, C. Cannabinoid system and neuroinflammation: Implications for multiple sclerosis. *Neuroimmunomodulation* **2007**, *14*, 182–187. [[CrossRef](#)]
52. Argente-Arizon, P.; Freire-Regatillo, A.; Argente, J.; Chowen, J.A. Role of non-neuronal cells in body weight and appetite control. *Front. Endocrinol.* **2015**, *6*, 42.
53. Geelissen, S.M.E.; Beck, I.M.E.; Darras, V.M.; Kühn, E.R.; Van der Geyten, S.; Kuhn, E.R.; Van der, G.S. Distribution and regulation of chicken growth hormone secretagogue receptor isoforms. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2003**, *134*, 167–174. [[CrossRef](#)]
54. Guan, X.; Yu, H.; Palyha, O.; McKee, K.; Feighner, S.; Sirinathsinghji, D.; Smith, R.; Van der Ploeg, L.; Howard, A. Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Mol. Brain Res.* **1997**, *48*, 23–29. [[CrossRef](#)]
55. 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*, 82–91. [[CrossRef](#)]
56. Espejo-Porrás, F.; Fernández-Ruiz, J.; Pertwee, R.G.; Mechoulam, R.; García, C. Motor effects of the non-psychotropic phytocannabinoid cannabidiol that are mediated by 5-HT1A receptors. *Neuropharmacology* **2013**, *75*, 155–163. [[CrossRef](#)]
57. García, C.; Palomo-Garo, C.; Gómez-Gálvez, Y.; Fernández-Ruiz, J. Cannabinoid–dopamine interactions in the physiology and pathophysiology of the basal ganglia. *Br. J. Pharmacol.* **2016**, *173*, 2069–2079. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Valdeolivas, S.; Sagredo, O.; Delgado, M.; Pozo, M.; Fernández-Ruiz, J. Effects of a sativex-like combination of phytocannabinoids on disease progression in R6/2 mice, an experimental model of Huntington’s disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 684. [[CrossRef](#)]
59. Libro, R.; Diomedea, F.; Scionti, D.; Piattelli, A.; Grassi, G.; Pollastro, F.; Bramanti, P.; Mazzon, E.; Trubiani, O. Cannabidiol modulates the expression of Alzheimer’s disease-related genes in mesenchymal stem cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *18*, 26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

60. Haider, A.; Spinelli, F.; Herde, A.M.; Mu, B.; Keller, C.; Margelisch, M.; Weber, M.; Schibli, R.; Mu, L.; Ametamey, S.M. Evaluation of 4-oxo-quinoline-based CB2 PET radioligands in R6/2 chorea huntington mouse model and human ALS spinal cord tissue. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *145*, 746–759. [[CrossRef](#)]
61. Zeissler, M.-L.; Eastwood, J.; McCorry, K.; Hanemann, O.C.; Zajicek, J.P.; Carroll, C.B. Delta-9-tetrahydrocannabinol protects against MPP+ toxicity in SH-SY5Y cells by restoring proteins involved in mitochondrial biogenesis. *Oncotarget* **2016**, *7*, 46603–46614. [[CrossRef](#)]
62. Lafuente, H.; Alvarez, F.J.; Pazos, M.R.; Alvarez, A.; Rey-Santano, M.C.; Mielgo, V.; Murgia-Esteve, X.; Hilario, E.; Martinez-Orgado, J. Cannabidiol reduces brain damage and improves functional recovery after acute hypoxia-ischemia in newborn pigs. *Pediatr. Res.* **2011**, *70*, 272–277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Borroto-Escuela, D.O.; Brito, I.; Romero-Fernandez, W.; Di Palma, M.; Oflijan, J.; Skieterska, K.; Duchou, J.; Van Craenenbroeck, K.; Suárez-Boomgaard, D.; Rivera, A.; et al. The G protein-coupled receptor heterodimer network (GPCR-HetNet) and its hub components. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 8570–8590. [[CrossRef](#)]
64. Ferré, S.; Baler, R.; Bouvier, M.; Caron, M.G.; Devi, L.A.; Durrux, T.; Fuxe, K.; George, S.R.; Javitch, J.A.; Lohse, M.J.; et al. Building a new conceptual framework for receptor heteromers. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 131–134. [[CrossRef](#)]
65. Franco, R.; Martínez-Pinilla, E.; Lanciego, J.L.; Navarro, G. Basic pharmacological and structural evidence for class A G-protein-coupled receptor heteromerization. *Front. Pharmacol.* **2016**, *7*, 76. [[CrossRef](#)]
66. Franco, R.; Aguinaga, D.; Jiménez, J.; Lillo, J.; Martínez-Pinilla, E.; Navarro, G. Biased receptor functionality versus biased agonism in G-protein-coupled receptors. *Biomol. Concepts* **2018**, *9*, 143–154. [[CrossRef](#)]
67. Harikumar, K.G.; Morfis, M.M.; Sexton, P.M.; Miller, L.J. Pattern of intra-family hetero-oligomerization involving the G-protein-coupled secretin receptor. *J. Mol. Neurosci.* **2008**, *36*, 279–285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Casanovas, M.; Jiménez-Rosés, M.; Cordoní, A.; Lillo, A.; Vega-Quiroga, I.; Izquierdo, J.; Medrano, M.; Gysling, K.; Pardo, L.; Navarro, G.; et al. Discovery of a macromolecular complex mediating the hunger suppressive actions of cocaine: Structural and functional properties. *Addict. Biol.* **2021**, e13017. [[CrossRef](#)]
69. Medrano, M.; Aguinaga, D.; Reyes-Resina, I.; Canela, E.I.; Mallol, J.; Navarro, G.; Franco, R. Orexin A/hypocretin modulates leptin receptor-mediated signaling by allosteric modulations mediated by the ghrelin GHS-R1A receptor in hypothalamic neurons. *Mol. Neurobiol.* **2018**, *55*, 4718–4730. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Agudo, J.; Martín, M.; Roca, C.; Molas, M.; Bura, A.S.; Zimmer, A.; Bosch, F.; Maldonado, R. Deficiency of CB2 cannabinoid receptor in mice improves insulin sensitivity but increases food intake and obesity with age. *Diabetologia* **2010**, *53*, 2629–2640. [[CrossRef](#)]
71. Miller, A.A.; Spencer, S.J. Obesity and neuroinflammation: A pathway to cognitive impairment. *Brain. Behav. Immun.* **2014**, *42*, 10–21. [[CrossRef](#)]
72. Kang, S.S.; Kurti, A.; Fair, D.A.; Fryer, J.D. Dietary intervention rescues maternal obesity induced behavior deficits and neuroinflammation in offspring. *J. Neuroinflammation* **2014**, *11*, 156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Abu-Rmeileh, N.M.E.; Hart, C.L.; McConnachie, A.; Upton, M.N.; Lean, M.E.J.; Watt, G.C.M. Contribution of midparental BMI and other determinants of obesity in adult offspring. *Obesity* **2008**, *16*, 1388–1393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Carriba, P.; Navarro, G.; Ciruela, F.; Ferré, S.; Casadó, V.; Agnati, L.; Cortés, A.; Mallol, J.; Fuxe, K.; Canela, E.I.E.I.; et al. Detection of heteromerization of more than two proteins by sequential BRET-FRET. *Nat. Methods* **2008**, *5*, 727–733. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Navarro, G.; Hradsky, J.; Lluís, C.; Casadó, V.; McCormick, P.J.; Kreutz, M.R.; Mikhaylova, M. NCS-1 associates with adenosine A(2A) receptors and modulates receptor function. *Front. Mol. Neurosci.* **2012**, *5*, 53. [[CrossRef](#)]

3.3. Cannabidiol skews biased agonism at cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors with smaller effect in CB₁-CB₂ heteroreceptor complexes.

Gemma Navarro, Irene Reyes-Resina, Rafael Rivas-Santisteban, Verónica Sánchez de Medina, Paula Morales, Salvatore Casano, Carlos Ferreiro-Vera, **Alejandro Lillo**, David Aguinaga, Nadine Jagerovic, Xavier Nadal i Rafael Franco.

Article publicat a la revista *Biochemical Pharmacology*, Setembre 2018. doi: 10.1016/j.bcp.2018.08.046.

Actualment, l'estudi de l'agonisme esbiaixat és una de les aproximacions biomèdiques més punteres pel desenvolupament de nous compostos amb propietats terapèutiques. La informació que s'obté mitjançant la investigació de l'agonisme esbiaixat podria arribar a permetre la selecció d'aquells compostos que activen una via de senyalització amb efectes beneficiosos i descartar aquells compostos que desencadenen una funcionalitat amb efectes secundaris indesitjats. En aquest estudi, es va analitzar la funcionalitat d'una llibreria de compostos cannabinoides en presència i absència de cannabidiol (CBD), a través de l'anàlisi d'acumulació d'AMPc intracel·lular, la fosforilació de les MAPK, el reclutament de β -arrestines i la redistribució dinàmica de masses (DMR) en cèl·lules HEK-293T transfectades amb el receptor CB₁, el receptor CB₂ o l'heteròmer de receptors CB₁-CB₂. Els resultats obtinguts demostren que una concentració de 100 nM del compost CBD no permet la seva unió, de forma significativa, al centre ortostèric de cap dels dos receptors cannabinoides. De manera interessant, els dos compostos cannabinoides que presenten efectes psicoactius en l'organisme humà, el Δ^9 -THC i el CP-55940, van mostrar un agonisme esbiaixat similar sobre el receptor CB₁. D'altra banda, el Δ^9 -THC fou incapaç d'activar la senyalització G_i en actuar sobre el receptor CB₂. A més, el fenomen d'agonisme esbiaixat es va veure reduït en cèl·lules HEK-293T que expressaven l'heteròmer CB₁R-CB₂R. Per últim, és important destacar que el contractament amb CBD fou capaç de modificar la funcionalitat dels compostos cannabinoides estudiats mitjançant la seva unió a la butxaca al·lostèrica dels receptors cannabinoides CB₁ i CB₂.



Cannabidiol skews biased agonism at cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors with smaller effect in CB₁-CB₂ heteroreceptor complexes

Gemma Navarro^{a,b}, Irene Reyes-Resina^{b,c}, Rafael Rivas-Santisteban^{b,c}, Verónica Sánchez de Medina^d, Paula Morales^e, Salvatore Casano^d, Carlos Ferreiro-Vera^d, Alejandro Lillo^c, David Aguinaga^c, Nadine Jagerovic^e, Xavier Nadal^{d,*}, Rafael Franco^{b,c,*}

^a Molecular Neurobiology Laboratory, Department of Biochemistry and Physiology, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

^b Centro de Investigación en Red, Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

^c Molecular Neurobiology Laboratory, Department of Biochemistry and Molecular Biomedicine, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

^d Phytoplant Research S.L., Córdoba, Spain

^e Instituto de Química Médica, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

BRET
CNS
Drug discovery
Endocannabinoids
G-protein-coupled receptor
Phytocannabinoids

ABSTRACT

Currently, biased agonism is at the center stage of drug development approaches. We analyzed effects of a battery of cannabinoids plus/minus cannabidiol (CBD) in four functional parameters (cAMP levels, phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2), β -arrestin recruitment and label-free/DMR) in HEK-293T cells expressing cannabinoid receptors, CB₁ or CB₂, or CB₁-CB₂ heteroreceptor complexes. In all cases two natural agonists plus two selective synthetic agonists were used. Furthermore, the effect of cannabidiol, at a dose (100 nM) that does not allow significant binding to the orthosteric center of either receptor, was measured. From the huge amount of generated data, we would like to highlight that the two psychotropic molecules (Δ^9 -tetrahydrocannabinol/THC and CP-55940) showed similar bias in CB₁R and that the bias of THC was particularly relevant toward MAPK pathway. Furthermore, THC did not activate the G_i protein coupled to CB₂R. Interestingly, the biased agonism was reduced when assays were performed in cells expressing the two receptors, thus suggesting that the heteromer allows less functional selectivity. In terms of cannabidiol action, the phytocannabinoid altered the functional responses, likely by allosteric means, and modified potency, agonist IC₅₀/EC₅₀ values and biased agonism in qualitative and/or quantitative different ways depending on the agonist. The effect of cannabidiol on anandamide actions on both cannabinoid receptors was particularly noteworthy as was significantly different from that of other compounds. Results are a compendium of data on biased agonism on cannabinoid receptors in the absence and presence of cannabidiol. In addition, for the first time, GPCR biased agonism is characterized in an heteromeric context.

1. Introduction

Endocannabinoid function is mediated by the two main endocannabinoids, anandamide and 2-arachidonoylglycerol (2-AG), and the cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors, which also respond to phytocannabinoids derived from *Cannabis sativa* L. CB₁ and CB₂ are class A rhodopsin-like members of the superfamily of G-protein-coupled receptors (GPCR) and their cognate protein is G_i, i.e. their activation by cannabinoids leads to the inhibition of adenylate cyclase activity and the decrease of intracellular cAMP levels. The hydrophobic nature of

the endogenous agonists, 2-AG and anandamide, is an important issue to understand cannabinoid receptor pharmacology. The binding mode of receptor agonists seemingly contrasts with that of many of class A GPCRs, whose orthosteric site is formed by a cavity located within the seven transmembrane helix barrel and, therefore, is open wide to the extracellular milieu [1,2]. The elucidation of the structure of the CB₁ receptor, recently achieved in two different laboratories, confirmed the hydrophobicity hypothesis but adds a new element, namely that the orthosteric site is hidden by the N-terminal end of the receptor that acts as a lid. Accordingly, it is now hypothesized that agonists enter to the

* Corresponding authors at: The Science and Technology Park of Córdoba-Rabanales 21, Astrónoma Cecilia Payne Street, Centauro Building, B-1, 14014 Córdoba, Spain (X. Nadal). Dept. Biochemistry and Molecular Biomedicine, School of Biology, University of Barcelona, Avda. Diagonal 643, Prevosti Building, 08028 Barcelona, Spain (R. Franco).

E-mail addresses: x.nadal@phytoplant.es (X. Nadal), rfranco@ub.edu (R. Franco).

<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.08.046>

Received 31 May 2018; Accepted 31 August 2018

Available online 06 September 2018

0006-2952/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.