

Trabajo Fin de Grado
Grado en Bioquímica y Biología Molecular

Caracterización de la selectividad funcional y modulación alostérica de los ligandos THC, WIN 55,212-2, HU-210 y CBD sobre receptores cannabinoides

Autor:
Iván Bedia Viscarolasaga

Directora:
Rebeca Diez-Alarcia

Co-directora:
Leyre Urigüen Echeverria

Índice

1. Introducción	1
1.1. Potencial terapéutico de los cannabinoides.....	1
1.2. Sistema endocannabinoide	1
1.2.1. Receptor CB1 y selectividad funcional	2
1.2.1.1. Señalización a través de proteínas G.....	2
1.2.1.2. Señalización a través de β -arrestinas.....	3
1.2.1.3. Modulación alostérica de la señalización.....	3
1.3. Ligandos cannabinoides	4
1.3.1. Fitocannabinoides	4
1.3.1.1. THC.....	4
1.3.1.2. CBD.....	5
1.3.2. Ligandos sintéticos	5
2. Objetivos.....	5
3. Materiales y métodos	6
3.1. Elección de los ligandos.....	6
3.2. Preparación de membranas de corteza cerebral humana post-mortem.....	6
3.3. Antibody-Capture [³⁵ S] GTP γ S Scintillation Proximity Assay (SPA).....	6
3.4. Análisis de datos.....	8
4. Resultados	8
4.1. Efectos del THC, WIN 55,212-2 y HU-210 en la activación de diferentes subtipos de proteínas G en corteza cerebral humana post-mortem.....	8
4.2. Efecto del CBD en la regulación de diferentes subtipos de proteínas G en corteza cerebral humana post-mortem	9
4.3. Modulación de la activación de proteínas G en respuesta a THC y WIN 55,212-2, por parte del CBD	10
5. Discusión.....	11
5.1. Selectividad funcional de los receptores cannabinoides en respuesta a THC, WIN 55,212-2 y HU-210 en corteza cerebral humana post-mortem	12
5.2. CBD: Selectividad funcional y modulación alostérica.....	13
6. Conclusiones.....	14
7. Bibliografía.....	14
8. Anexos e información complementaria	16
8.1. Anexo 1: Estructura de los ligandos cannabinoides	16
8.2. Anexo 2. Composición de las disoluciones empleadas	16
8.3. Anexo 3: Anticuerpos diluciones y concentraciones de GDP empleadas en centelleo por proximidad del [³⁵ S] GTP γ S.....	16
8.4. Anexo 4: Protocolo de centelleo por proximidad del [³⁵ S] GTP γ S acoplado a una etapa de inmunoprecipitación	17

1. Introducción

1.1. Potencial terapéutico de los cannabinoides

La planta del cannabis (*Cannabis sativa*) ha sido empleada durante miles de años tanto con fines recreativos como médicos [1,2,3]. Actualmente esta planta y sus derivados (cannabinoides) han generado un gran interés dentro del campo de la medicina debido a sus posibles aplicaciones en el tratamiento de trastornos neurológicos y psiquiátricos, entre otros [4]. Entre las propiedades de los cannabinoides aplicables a la clínica encontramos, por ejemplo, sus efectos analgésicos, antiepilépticos, antidepresivos, antipsicóticos, antiinflamatorios o neuroprotectores [1,5].

De los más de 100 compuestos bioactivos encontrados en esta planta (fitocannabinoides) destacan por su abundancia el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC o simplemente THC), siendo este el responsable de los efectos psicoactivos del cannabis, y el cannabidiol (CBD), que no presenta psicoactividad [3]. Las propiedades farmacocinéticas de estos compuestos, así como su amplio índice terapéutico [5] hacen que sean componentes interesantes en la clínica. Además de estos, en el cannabis encontramos gran variedad de otros compuestos minoritarios que pueden tener también interés terapéutico [6].

Actualmente se han aprobado varios medicamentos que emplean estas sustancias, de forma aislada o combinada para el tratamiento de distintas patologías [6]. Algunos ejemplos son Epidiolex®, un extracto enriquecido de CBD que se emplea en epilepsia asociada a los síndromes de Dravet y Lennox-Gastaut en pacientes pediátricos [6] o Sativex®, un spray compuesto por THC:CBD en una relación 1:1 que se emplea en el tratamiento de la espasticidad y el dolor asociados a esclerosis múltiple. Pese a que ya existan fármacos y la evidencia recogida de ensayos clínicos, experimentos *in vivo* e *in vitro* y observaciones en la vida real parecen indicar el potencial terapéutico de estos compuestos, la dificultad de separar los efectos terapéuticos de los efectos no deseados y el escaso conocimiento sobre su mecanismo de acción, han limitado la comercialización de más fármacos basados en estos compuestos [1,2].

1.2. Sistema endocannabinoide

Los potenciales beneficios terapéuticos de los cannabinoides, así como su efecto psicoactivo, se atribuyen a su interacción con el sistema endocannabinoide. Este sistema de señalización está implicado en la regulación de la homeostasis a nivel de célula, tejido y órgano, en el desarrollo del cerebro, la regulación de la neurotransmisión, la plasticidad sináptica y la liberación de citoquinas, entre otras funciones [7]. Se ha observado que el sistema endocannabinoide se encuentran alterado en la mayoría de los trastornos neurológicos y psiquiátricos, y que la manipulación genética de los componentes de este sistema en animales ha demostrado tener efectos positivos sobre estas patologías [7].

El sistema endocannabinoide está formado principalmente por dos subtipos de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), CB1, principalmente expresado en sistema nervioso central (SNC), y CB2, mayoritariamente expresado en células inmunes, los endocannabinoides 2-araquidonilglicerol (2-AG) y anandamida (AEA), así como los enzimas encargados de su síntesis y degradación, siendo los más importantes la hidrolasa de amidas de ácidos grasos, (FAAH) y la monoacilglicerol lipasa (MAGL) [2].

El receptor cannabinoide CB1 es el GPCR más abundante en el SNC [8]. La activación de este receptor por ligandos como el THC o los endocannabinoides está relacionada con el metabolismo cerebral, la formación de la memoria, la plasticidad sináptica o la neurogénesis en el cerebro adulto, por lo que podría ser una diana interesante también en trastornos neurodegenerativos [7].

El nivel de expresión del receptor CB1 varía en distintos tipos celulares y regiones del SNC. Esta expresión diferencial, así como los distintos contextos celulares en los que se expresa, afecta a los diferentes mecanismos de señalización en los que puede participar CB1 [8].

1.2.1. Receptor CB1 y selectividad funcional

El receptor CB1, como miembro de la superfamilia de los GPCR, tiene como principal mecanismo de transmisión de señales externas al interior celular la activación de proteínas G heterotriméricas, de las que se han descrito cuatro familias en función de su subunidad α ($G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q/11}$, $G\alpha_{12/13}$), con respuestas celulares distintas en cada uno de los casos. Sin embargo, además de interactuar con proteínas G, estos receptores pueden activar otras vías de señalización a través de β -arrestinas o mediante la activación directa de quinasas intracelulares [8,9].

En esta clase de receptores que pueden actuar a través de varias vías de señalización, se ha visto que diferentes ligandos, en función de su estructura, pueden estabilizar alguna de las diferentes conformaciones que el receptor puede adoptar, lo cual provoca que este estimule preferentemente una determinada vía de señalización y provoque una respuesta celular diferente de la que provocaría otro ligando sobre el mismo receptor. Esta característica se denomina “*biased signaling*” o selectividad funcional [8,9,10]. Esta selectividad funcional no depende únicamente del ligando, sino también del contexto y tipo celular en el que se exprese el receptor, de la presencia y abundancia de determinadas proteínas intracelulares con las que pueda interactuar, etc. [8,9].

Además, la selectividad funcional puede ser inducida por la presencia de un modulador alostérico que tras unirse simultáneamente al receptor puede determinar qué tipo de señalización activará un ligando ortostérico. También se ha propuesto que la unión de un ligando alostérico a un receptor en ausencia del ligando ortostérico puede alterar la conformación del receptor y promover la activación de vías de señalización distintas de las preferentemente activadas en su ausencia [10,11].

1.2.1.1 Señalización a través de proteínas G

La función mejor descrita de este receptor consiste en la inhibición retrógrada de la neurotransmisión (Fig. 2). Cuando una neurona postsináptica recibe un estímulo libera endocannabinoides al espacio sináptico, donde estos se unirán al receptor CB1 presináptico acoplado a proteínas $G\alpha_{i/o}$ [5,12], lo que inhibirá la adenilato ciclasa (AC) y la producción de cAMP, que a su vez inhibe los canales de Ca^{2+} . Además, a través de las subunidades $\beta\gamma$, activa canales de K^+ , hiperpolarizando la neurona pre-sináptica e impidiendo la liberación de neurotransmisores [5], alterando así el comportamiento y plasticidad de las sinapsis [10]. Se ha propuesto que este mecanismo tiene funciones protectoras frente a la excesiva señalización que pudiese suponer un estrés a las células [8].

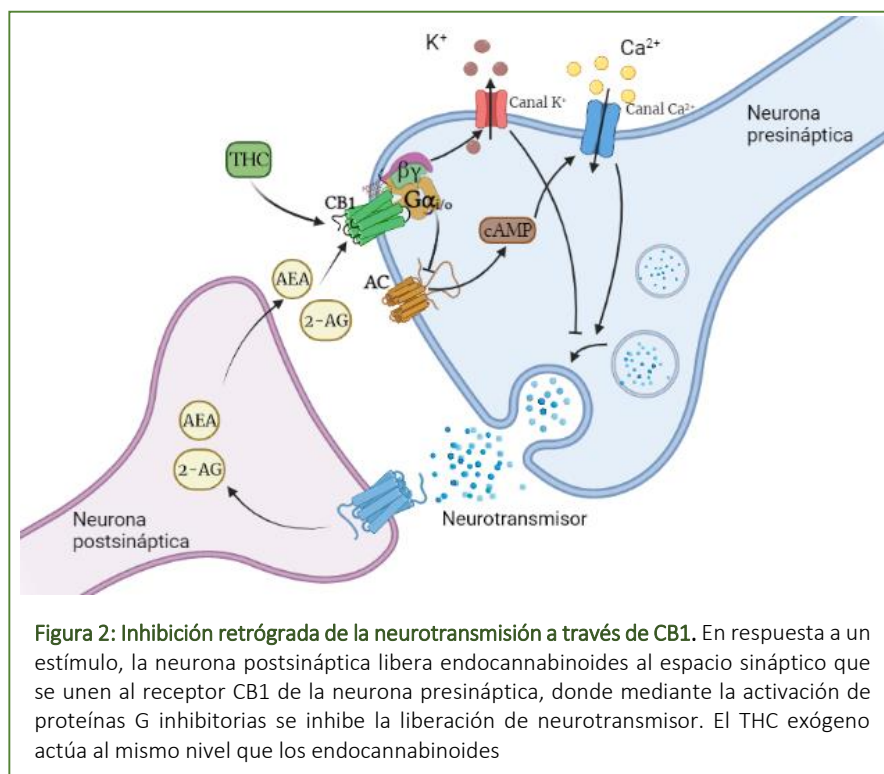


Figura 2: Inhibición retrógrada de la neurotransmisión a través de CB1. En respuesta a un estímulo, la neurona postsináptica libera endocannabinoides al espacio sináptico que se unen al receptor CB1 de la neurona presináptica, donde mediante la activación de proteínas G inhibitorias se inhibe la liberación de neurotransmisor. El THC exógeno actúa al mismo nivel que los endocannabinoides

Pese a que la interacción mejor descrita entre CB1 y proteínas G se da con $G\alpha_{i/o}$, hay evidencias de que este receptor puede interaccionar con otros tipos de proteínas G. En trabajos en los que se inhibe la asociación con $G\alpha_{i/o}$ mediante PTX, se ha visto que CB1 puede interaccionar con la subunidad $G\alpha_s$ [11,22], la cual estimula AC aumentando la producción de cAMP, provocando respuestas celulares distintas a las observadas en el mecanismo de inhibición retrograda de la neurotransmisión [8]. Fisiológicamente, esta interacción entre CB1 y $G\alpha_s$ se ha observado en aquellas células en las que el receptor forma heterodímeros con el receptor de dopamina D2 [8]. Por otro lado, el receptor CB1 es capaz de asociarse con otras proteínas, como CRIP1A, y con otros GPCRs (opioides, serotoninérgicos...) formando homo o heterómeros que también modulan su señalización [8].

La función de CB1 también es dependiente del tipo celular en que se exprese. Estudios en astrocitos de ratón han demostrado que la activación de CB1 en respuesta a agonistas exógenos como THC y WIN 55212-2, puede aumentar la concentración de Ca^{2+} intracelular por medio de la interacción con proteínas del tipo $G\alpha_q$ y la consiguiente activación de la fosfolipasa C (PLC), lo que provocaría la liberación de gliotransmisores afectando a las neuronas cercanas y participando en procesos de consolidación de la memoria [8,11,12].

Las proteínas $G\alpha_{12/13}$ son otro tipo de proteínas G que parecen estar activadas por CB1. La subunidad $G\alpha_{12/13}$ se encarga de activar la GTPasa RhoA, relacionada con la regulación del citoesqueleto y activación de quinasas de respuesta extracelular (ERK). La activación de esta subunidad puede estar relacionada con la regulación del crecimiento de neuritas en el hipocampo. Sin embargo, la evidencia de la interacción entre CB1 y $G\alpha_{12/13}$, es limitada y presenta datos no concluyentes [11,12].

Asimismo, el receptor CB1, a través de las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas G puede activar a ERK, así como la vía de PI3K/Akt/ mTOR, lo que estimula la síntesis de proteínas y participa en la regulación de la plasticidad sináptica, además de regular la transcripción de genes que participan en el crecimiento y la supervivencia celular [8,13].

1.2.1.2 Señalización a través de β -arrestinas

Como otros GPCRs, CB1, además de interaccionar con proteínas G heterotriméricas, es capaz de activar vías de señalización a través de β -arrestinas. Existen dos tipos de β -arrestinas con las que puede interactuar CB1, la β -arrestina 1 parece estar implicada en la activación de quinasas intracelulares, mientras que β -arrestina 2 parece estar relacionada con la internalización y desensibilización del receptor [10,11]. La interacción de CB1 con β -arrestinas 2 en respuesta a agonistas como AMB-FUBINACA o THC puede provocar la internalización y “*down-regulation*” del receptor, siendo una posible causa de la dependencia y adicción al cannabis [10,11].

Como se ha comentado en el párrafo anterior, la interacción con β -arrestinas también puede provocar la activación de ERK, aunque los efectos fisiológicos de la activación de ERK, son diferentes en función de si se trata de una activación por la vía de las proteínas G o β -arrestinas [10,11].

1.2.1.3. Modulación alostérica de la señalización

Hemos visto que CB1 puede actuar por varias vías de señalización, entre las que se encuentran los distintos tipos de proteínas $G\alpha$ y las β -arrestinas. Todavía no se conoce bien qué agonistas y a través de qué mecanismos actúan preferentemente sobre una u otra vía de señalización [11], sin embargo, sí se sabe que el perfil de señalización de estos agonistas puede estar regulado por moduladores alostéricos.

La pregnenolona, una hormona esteroide endógena, actúa como inhibidor alostérico de la señalización de THC, que es capaz de reducir la activación de determinadas vías como β -arrestinas, pero no afecta a la señalización mediante proteínas G [8,11]. Se ha planteado que el CBD también pueda actuar como modulador alostérico, afectado a la selectividad funcional de determinados ligandos [16].

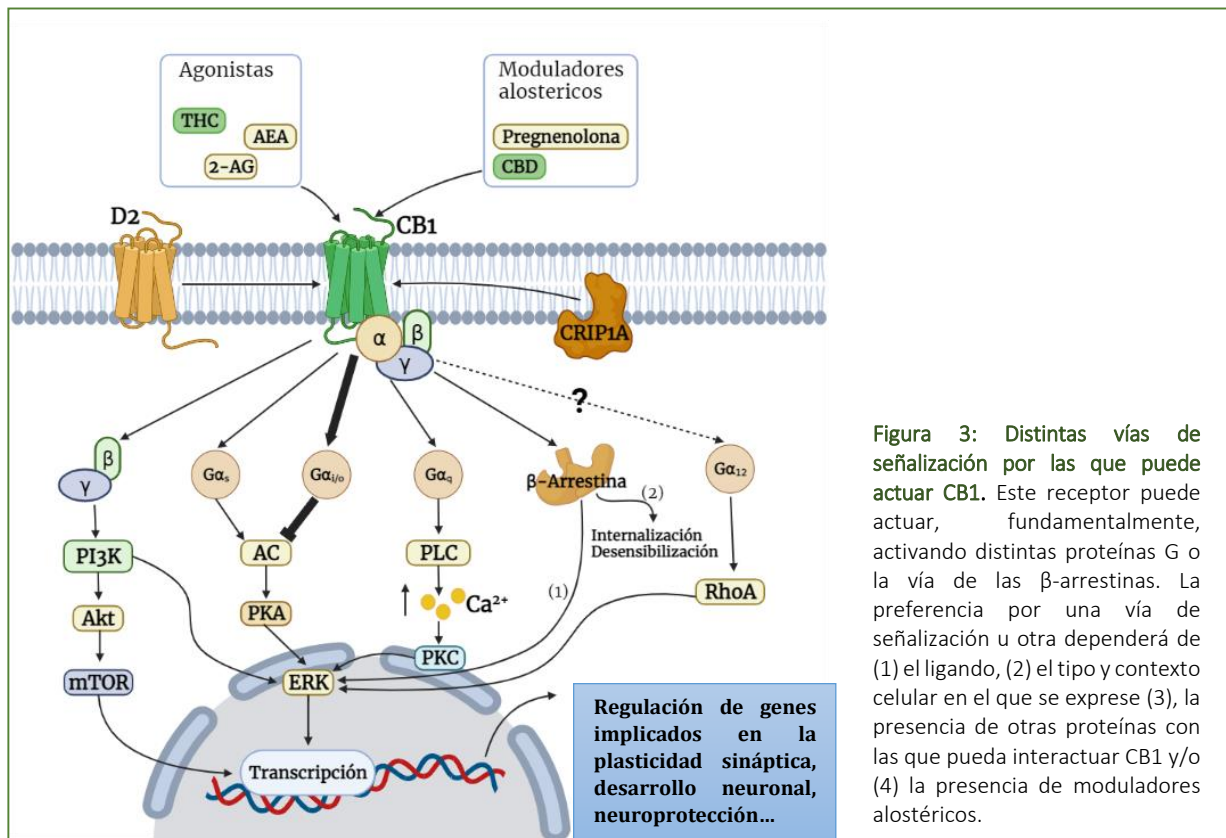


Figura 3: Distintas vías de señalización por las que puede actuar CB1. Este receptor puede actuar, fundamentalmente, activando distintas proteínas G o la vía de las β-arrestinas. La preferencia por una vía de señalización u otra dependerá de (1) el ligando, (2) el tipo y contexto celular en el que se exprese (3), la presencia de otras proteínas con las que pueda interactuar CB1 y/o (4) la presencia de moduladores alostéricos.

Como se ha descrito anteriormente, el receptor CB1 puede participar en mecanismos de defensa frente a un exceso de excitación, mediante la vía clásica de la inhibición retrograda de la neurotransmisión, y también se ha implicado en la regulación de la transcripción de genes que controlan la supervivencia y desarrollo neuronal, mediante la activación de vías alternativas. Por otro lado, el receptor CB2 (menos expresado en SNC) participa en los procesos de regulación de la neuroinflamación. Teniendo en cuenta el papel neuroprotector de los procesos que regulan estos receptores, su modulación por ligandos exógenos (THC y CBD) puede ser interesante en el tratamiento de diferentes trastornos psiquiátricos, del desarrollo, neurológicos (epilepsia, espasticidad...) [13].

1.3. Ligandos cannabinoides

1.3.1. Fitocannabinoides

Los fitocannabinoides son los cannabinoides exógenos derivados de la planta del cannabis, entre los que destacan el THC y CBD.

1.3.1.1 THC

El THC es un agonista exógeno de CB1/CB2 que presenta por estos una afinidad mayor que los agonistas endógenos [1]. La unión del THC a este receptor en corteza cerebral de ratón provoca la activación de proteínas Gα inhibitorias, en concreto Gα_{i1}, Gα_o y Gα_z. Del mismo modo, el THC parece activar la proteína Gα_{q/11} con la consiguiente activación de PLC y el aumento del Ca²⁺ intracelular [12].

Además de activar la señalización por proteínas G, el THC también promueve la interacción entre CB1 y β-arrestinas provocando, preferentemente, la internalización del receptor mediada por β-arrestina 2 [11,14].

Aparte de los receptores CB1 y CB2, el THC puede activar al receptor GPR55, considerado un tercer receptor cannabinoide, y activar la señalización a través de proteínas Gα₁₃, Gα_q o Gα₁₂ [1,15].

1.3.1.2 CBD

El CBD es el principal componente no psicoactivo de la planta *Cannabis sativa*. A este compuesto se le atribuyen gran cantidad de potenciales propiedades terapéuticas interesantes, tales como capacidades antioxidantes, antiinflamatorias, ansiolíticas, antipsicóticas, antidepresivas y neuroprotectoras, por citar algunas [2,5].

Aunque el mecanismo concreto se desconoce, se ha propuesto que el CBD realiza estas funciones a través de su interacción con diferentes receptores entre los que se encuentran GPCRs (CB1/2, receptor de serotonina 5HT_{1A}, receptor de adenosina A_{2A}, GPR55), canales iónicos (TRPV) y receptores nucleares (PPAR γ) [5], siendo los receptores 5HT_{1A} y TRPV sus principales dianas [2]. Algunos de los efectos del CBD se han atribuido al antagonismo del receptor GPR55 [15].

A diferencia del THC, el CBD presenta baja afinidad por el receptor CB1 sobre el que se ha propuesto que actuaría como modulador alostérico negativo, reduciendo la activación inducido por THC o los endocannabinoides [16], tanto a nivel de ERK, como del reclutamiento de β -arrestinas [14].

1.3.2. Ligandos sintéticos

Además de los fitocannabinoides, se han desarrollado gran variedad de ligandos sintéticos con capacidad de unirse a los receptores cannabinoides y que son empleados en investigación [19]. Entre ellos destaca el WIN 55,212-2, agonista no selectivo CB1/CB2 que produce efectos similares al THC pese a no presentar semejanza estructural con este [20]. *In vivo*, la interacción de WIN 55,212-2 con receptores cannabinoides parece reducir la inflamación causada por β -amiloide, así como tener efectos anticonvulsivos [19]. WIN 55,212-2 ha demostrado una buena capacidad de activar subunidades $G\alpha$ inhibitorias [18]. Sin embargo, también se ha demostrado en tejido cerebral de ratón que este agonista es capaz de activar otro tipo de subunidades, como $G\alpha_z$, $G\alpha_{q/11}$ y $G\alpha_{12/13}$ [12], y no se ha asociado a una vía de señalización específica ya que puede inhibir producción de cAMP, así como promover la fosforilación de ERK [18].

HU-210 es un análogo sintético del THC, también muy empleado en investigación, que es capaz de promover la activación de subunidades $G\alpha_{i/o}$, conduciendo a una inhibición de la producción de cAMP. Se ha demostrado que este potente agonista CB1/CB2 es capaz de provocar algunos de los efectos típicos de la señalización mediante CB1, tales como la fosforilación de ERK y un aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular. Pese a que los receptores cannabinoides estas normalmente asociados con funciones inhibitorias, y, como ya se ha descrito para otros ligandos, se ha demostrado que HU-210 tiene cierta capacidad de activar subunidad $G\alpha_s$ [21].

2. Objetivos

Como ya se ha descrito anteriormente, la modulación farmacológica de los receptores cannabinoides, mediante fitocannabinoides puede ser interesante en el tratamiento de algunos trastornos neurológicos. Sin embargo, actualmente no se han conseguido ligandos capaces de aportar estos beneficios, sin provocar efectos adversos, *on/off target* [10]. Un mayor conocimiento de la selectividad funcional de este receptor en respuesta a estas sustancias podría conducir al desarrollo de fármacos más seguros y eficaces que careciesen de esos efectos adversos.

Es por estos motivos que los objetivos de este trabajo son:

1. Describir el perfil de activación de subunidades $G\alpha$ en respuesta a THC, WIN 55,212-2, HU210 y CBD, en corteza cerebral humana post-mortem.
2. Determinar si esta activación de subunidades $G\alpha$ esta mediada por receptores CB1/CB2,
3. Describir, en caso de que existiese, el efecto modulador alostérico del CBD sobre la regulación de las proteínas $G\alpha$ por THC y WIN 55,212-2.

3. Materiales y métodos

3.1. Elección de los ligandos

En este trabajo se han utilizado varios ligandos cannabinoides que interactúan con el receptor CB1. Se eligió el THC (*THCPharm GmbH, Frankfurt, Alemania*), puesto que se trata de uno de los principales componentes del cannabis, siendo el principal responsable de su uso recreativo y para el que se ha propuesto una potencial aplicación clínica. El CBD (*Axon MedChem, Groningen, Países Bajos*) se escogió por razones similares, al ser otro de los principales componentes del cannabis. El CBD no tiene efectos psicotrópicos y se ha propuesto su capacidad de modular de forma alostérica la actividad del receptor CB1 en respuesta a ligandos ortostéricos como el THC o los endocannabinoides, lo que lo convierte en un compuesto muy interesante desde el punto de vista farmacológico. Los cannabinoides sintéticos WIN 55,212-2 y HU-210 (*Tocris Bioscience, Bristol, UK*) fueron elegidos por tratarse de potentes agonistas CB1/CB2 bien descritos en la literatura. Para WIN5512-2 ya se ha descrito su perfil de activación de las proteínas G en tejido cerebral, por lo que sirve de control positivo, pero esto se desconoce para HU-210. Finalmente, se utilizó O-2050 (*Tocris Bioscience, Bristol, UK*) como antagonista CB1/CB2 para determinar si los efectos que se ven en la activación de proteínas G en respuesta a un determinado ligando se debe a la interacción con receptores cannabinoides o no.

3.2. Preparación de membranas de corteza cerebral humana post-mortem

Las muestras de tejido de corteza prefrontal dorsolateral humana post-mortem se obtuvieron en el marco de un convenio con el Instituto Vasco de Medicina Legal, Bilbao, cumpliendo con la legislación y comités éticos vigentes para la investigación con este tipo de muestras. En base a registros médicos y exámenes del tejido post-mortem se determinó la ausencia de patologías neurológicas y psiquiátricas, y la presencia de etanol o drogas en sangre en el momento del fallecimiento se consideró un criterio de exclusión. Se utilizaron muestras de seis sujetos diferentes (5 varones y 1 mujer) con edades entre 29 y 77 años, que se procesaron de manera conjunta.

Para la obtención de la fracción enriquecida en membranas celulares, las muestras de corteza fueron homogeneizadas mediante un homogenizador mecánico vidrio/teflón (IKA labor Technik, Satufen, Alemania) en 30 volúmenes de tampón de homogeneización.

El homogeneizado se somete entonces a una centrifugación suave a 1.000 g durante 5 minutos a 4 °C. Se recoge el sobrenadante de esta centrifugación y se somete a una centrifugación a 40.000 g durante 10 minutos a 4 °C. El precipitado se resuspende en 20 volúmenes de tampón de centrifugación y se centrifuga de nuevo a 40.000 g durante 10 minutos a 4 °C. Finalmente, este precipitado rico en membranas se resuspende en 5 volúmenes de tampón de incubación y se lleva a cabo la determinación de la concentración de proteínas en la muestra mediante el método de Bradford utilizando diluciones seriadas de concentración conocida de albúmina sérica bovina (BSA) como estándar. Mediante regresión lineal se extrapola la concentración de proteína en las muestras y se preparan alícuotas de 0,5/0,75/1 mg en tubos *Eppendorf*, que se centrifugan a 21.000 g. El sobrenadante se decanta y las muestras se congelan a -80°C hasta el ensayo.

3.3. Antibody-Capture [³⁵S]GTPγS Scintillation Proximity Assay (SPA)

La activación de determinadas proteínas G acopladas al receptor CB1 en respuesta a determinados ligandos se midió utilizando un protocolo de centelleo por proximidad del [³⁵S]GTPγS acoplado a una etapa de inmunoprecipitación con anticuerpos específicos contra cada tipo de subunidad Gα.

Estos ensayos se basan en la comparación entre varias condiciones de incubación. La fijación basal (BB), en la que se obtiene la unión basal del [³⁵S]GTPγS a las subunidades Gα en ausencia de ligando. La fijación inespecífica (NSB), correspondiente a la fijación de [³⁵S]GTPγS en presencia de un exceso de ligando no marcado (GTPγS 100 μM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) que desplaza el radioligando de los sitios de unión de las subunidades Gα, por lo que los valores de unión obtenidos se deberán a la interacción con membranas, otras proteínas o las propias subunidades Gα, pero en un lugar distinto de

su centro de unión. Este valor deberá ser restado del resto de condiciones para determinar únicamente la interacción específica. El efecto de los diferentes compuestos (THC, WIN 55,212-2, HU-210 y CBD) sobre la actividad de las proteínas G se determinó mediante la incubación a una concentración 10 μM de estos fármacos solos o en presencia del antagonista cannabinoide O-2050, también 10 μM , para demostrar si los efectos observados se deben a la interacción con receptores cannabinoideos o con otro GPCR. Para el objetivo 3, se llevó a cabo la incubación en presencia de concentraciones crecientes de WIN 55,212-2 o THC solos, o en presencia de CBD 1 μM para tratar de determinar su función como modulador alostérico.

Los ensayos se realizan en placas 96 pocillos (*PerkinElmer Life Sciences, Maanstraat, Alemania*), con un volumen total de 200 μl en tampón de incubación en presencia de [^{35}S]GTP γ S 0,4 nM, diferentes concentraciones de GDP y 11 μg de proteína.

En un primer momento se incuban las membranas con GDP (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, EEUU) a concentraciones distintas dependiendo de la subunidad $G\alpha$ que pretendamos estudiar. La función del GDP es unirse a las proteínas G promoviendo su estado heterotrimérico inactivo y reduciendo la fijación basal lo suficiente como para permitir detectar mejor la activación mediada por los diferentes fármacos.

Tras esta primera pre-incubación se añaden los fármacos a estudiar, WIN 55212-2, THC, HU-210 o CBD, a concentraciones diferentes dependiendo del experimento y se incuba 30'. En este trabajo, el CBD se ha empleado como modulador alostérico, cuando se emplea junto con THC o WIN 55,212-2 y como agonista cuando se emplea solo.

Tras la pre-incubación con los fármacos se añade el radioligando [^{35}S]GTP γ S (*PerkinElmer, Boston, MA, EEUU*) y se incuba la placa durante 1h 30' para que el ligando radiactivo se una a las proteínas G que estén siendo activadas por el receptor en respuesta a los diferentes fármacos.

Pasado este tiempo, se tratan las muestras con 20 μl de detergente (Igepal 1% + SDS 0.1%) para solubilizar las membranas e interrumpir la activación de subunidades $G\alpha$.

El siguiente paso consiste en la adición de 10 μl de anticuerpos específicos contra cada tipo de subunidad α de las proteínas G. Posteriormente se añaden 50 μl /pocillo (75 mg) de bolas centelleadoras ("beads") de poliviniltolueno (PVT) (*PerkinElmer, Boston, MA, EEUU*) recubiertas por proteína A, a la que se une la fracción cristalizable de los anticuerpos. Se incuba entonces durante 3h para permitir la unión de los anticuerpos a las *beads*.

A continuación, se sella la placa con un film adhesivo transparente y se centrifuga a 1.000 g durante 8 min. El objetivo de esta centrifugación es precipitar las *beads* que tienen unido el anticuerpo, que a su vez está interactuando con la proteína G de interés. De esta forma se separa la proteína G de interés del resto de subunidades que no han sido reconocidas por el anticuerpo y del radioligando libre que permanecen en disolución.

Finalmente se mide la radioactividad de la placa centrifugada en un contador de centelleo MicroBeta TriLux (*PerkinElmer, Boston, MA, EEUU*).

El fundamento de esta técnica se basa en la proximidad entre el [^{35}S]GTP γ S radiactivo y el agente "centelleante" de las *beads*. Esta proximidad permite a ambos compuestos interactuar de tal forma que permita la conversión de la radioactividad en una emisión de fotones detectable por el contador de centelleo. Esta emisión de fotones solo ocurrirá en los casos en los que el radioligando se encuentre próximo a las *beads*, esto es el [^{35}S]GTP γ S, que se encuentra interactuando con las subunidades α que hayan sido reconocidas por el anticuerpo. El resto de [^{35}S]GTP γ S, tanto libre como unido a otras subunidades $G\alpha$ no precipita junto con las *beads*, por lo que se mantiene soluble, y no puede interactuar con el agente "centelleante" y emitir fotones, por lo que la radioactividad de estos complejos no será detectada. De esta forma en cada pocillo medimos únicamente la radioactividad asociada al [^{35}S]GTP γ S que interactúa con una subunidad α específica y en la condición de incubación que corresponda (BB, NSB...) lo que nos permite medir específicamente la activación de un tipo concreto de subunidad $G\alpha$ acoplada a GPCRs. Para determinar el GPCR concreto responsable de los efectos observados se utiliza el antagonismo farmacológico, llevando a cabo la co-incubación en presencia de

antagonistas selectivos de los receptores a estudiar, en nuestro caso, si el efecto desaparece en presencia del antagonista CB1/CB2 O-2050, podremos decir que el efecto observado es mediado por receptores cannabinoides.

3.4. Análisis de datos

Los datos se analizaron utilizando el software *GraphPad Prism™* 9.3.1. A los datos de fijación de [³⁵S]GTPγS obtenidos para cada condición se les restó el valor de fijación inespecífica. Estos valores específicos fueron representados como porcentaje de la unión basal, en ausencia de compuestos, para cada subunidad Gα. Así, un fármaco agonista incrementará el valor de fijación respecto al basal. En el caso de los ensayos a una única concentración de los fármacos, la comparación estadística entre estos valores y el 100% se realizó mediante una prueba t de Student de una muestra. En los ensayos concentración-efecto, los datos se analizaron mediante ajuste no lineal asumiendo un modelo de un sitio de unión que permitió calcular los parámetros farmacológicos de efecto máximo (Emax) y la concentración que permite alcanzar el 50% de ese efecto máximo (EC₅₀).

4. Resultados

4.1. Efectos del THC, WIN 55,212-2 y HU-210 en la activación de diferentes subtipos de proteínas G en corteza cerebral humana post-mortem

En primer lugar, se caracterizó la selectividad funcional de la activación de subunidades Gα (Gα_{i1}, Gα_{i2}, Gα_{i3}, Gα_o, Gα_z, Gα_s, Gα_{q/11}, y Gα_{12/13}) en respuesta a distintos ligandos cannabinoides en corteza cerebral humana post-mortem.

Para empezar, se estudió el efecto del **THC**, a una concentración de 10 μM, en la activación de distintos subtipos de subunidades Gα (*Fig. 4A*). Como era esperable, el THC fue capaz de activar selectivamente y de manera significativa algunos subtipos de subunidades Gα inhibitorias, como Gα_{i1} (110,5 ± 4%, p 0,037 one-sample t-Test vs 100%) y Gα_o (114,4 ± 4%, p 0,01), mientras que no mostro ningún efecto significativo sobre la activación de otras subunidades Gα inhibitorias como Gα_{i2}, Gα_{i3} y Gα_z. Además de las subunidades Gα inhibitorias, el THC también demostró capacidad de activar selectivamente las subunidades Gα_{q/11} (118,9 ± 3%, p 0,02) y Gα_{12/13} (122,1 ± 3%, p 0,023). Por último, no se observó ningún efecto del THC sobre la activación de la subunidad Gα_s. Para demostrar que la activación de estas subunidades Gα por el THC era mediada por receptores cannabinoides, se realizaron los mismos experimentos en presencia de O-2050 a una concentración de 10 μM. Se observa como en todos los casos, la activación de las distintas subunidades Gα es bloqueada por O-2050 (*Fig. 4A*).

Del mismo modo se comprobó la distinta activación de subunidades Gα en respuesta al agonista cannabinoide **WIN55212-2** (*Fig. 4B*). Se observa como WIN55212-2 a una concentración de 10 μM es capaz de activar significativamente todas las subunidades Gα inhibitorias, Gα_{i1} (135,3 ± 8%, p 0,02), Gα_{i2} (145 ± 6%, p 0,057), Gα_{i3} (128,5 ± 5%, p 0,011), Gα_o (125,5 ± 6%, p 0,45) y Gα_z (127,7 ± 6%, p 0,017). Además, también es capaz de activar las subunidades Gα_{q/11} (136,6 ± 5%, p 0,004) y Gα_{12/13} (124,6 ± 6%, p 0,048). Sorprendentemente se observa también una ligera activación de la subunidad Gα_s (109,1 ± 2%, p 0,035). Al igual que con el THC, los efectos de WIN55212-2 fueron bloqueados por O-2050, lo que indica que se trata de un proceso mediado por receptores cannabinoides, a excepción de la subunidad Gα_{12/13}, lo que sugiere que la activación de esta subunidad puede estar mediada por otro receptor.

Finalmente se comprobó el efecto del **HU-210** (*Fig. 4C*). En respuesta a HU-210, se observa una activación de algunos subtipos de subunidades Gα inhibitorias, como Gα_{i1} (128,2 ± 6%, p 0,041), Gα_{i3} (122,3 ± 4%, p 0,033) y Gα_o (127,9 ± 0,04%, p 0,001), mientras que no se observa activación en el resto de subunidades inhibitorias, Gα_{i2} y Gα_z. Esta activación de subunidades Gα inhibitorias fue bloqueada por O-2050, lo cual demuestra que es un proceso mediado por receptores cannabinoides. Más sorprendente fue la activación de Gα_{q/11}, (125,2 ± 0,8%, p 0,001), que no fue bloqueada por O-2050, lo que indica que puede estar mediada por un receptor diferente de CB1/CB2. Finalmente, HU-210 no provoca una activación significativa de las subunidades Gα_s y Gα_{12/13}.

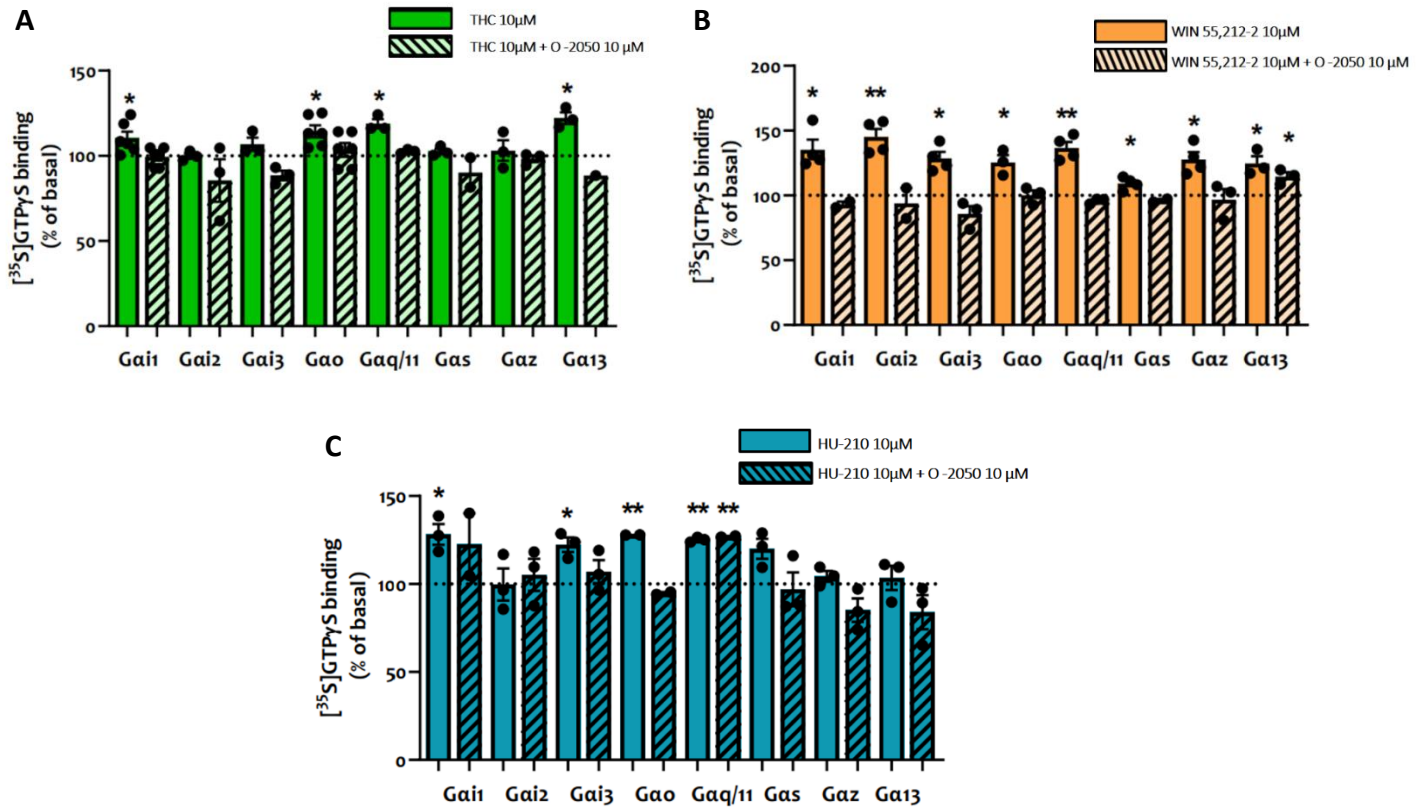


Figura 4: Efecto del THC, WIN 55,212-2 y HU-210 sobre la activación de distintas subunidades Gα. Resultados del ensayo de centelleo por proximidad de [³⁵S]GTPγS acoplado a inmunoprecipitación con anticuerpos específicos contra cada subunidad Gα (Gα_{i1}, Gα_{i2}, Gα_{i3}, Gα_o, Gα_z, Gα_s, Gα_{q/11}, y Gα_{12/13}) en corteza cerebral humana post-mortem, incubados con (A) THC (10 μM), (B) WIN 55,212-2 (10 μM) y (C) HU-210 (10 μM), en presencia o ausencia del antagonista cannabinoide O-2050 (10 μM). Los datos se muestran como porcentaje de la unión basal de [³⁵S]GTPγS a cada subunidad G en ausencia de compuestos. Las barras representan la media ± SEM de entre 3 y 5 experimentos realizados en triplicado. Los asteriscos representan aquellos valores que han demostrado una diferencia estadísticamente significativa respecto al 100% (One-sample t-test de Student; *p < 0,05, **p < 0,01)

4.2. Efecto del CBD en la regulación de diferentes subtipos de proteínas G en corteza cerebral humana post-mortem

Al igual que con los ligandos anteriores se midió el efecto del CBD sobre la activación de los distintos tipos de subunidades Gα (Fig. 5). Los resultados, en este caso, son más heterogéneos. El CBD parece no tener ningún efecto sobre la activación de las subunidades Gα_{i1}, Gα_z, Gα_s, y Gα_{12/13}, y únicamente activa de manera estadísticamente significativa las subunidades Gα_{i3} (117,7 ± 3%, p 0,006) y Gα_{q/11} (116,4 ± 3%, p 0,011). Cuando se realiza la co-incubación en presencia de O-2050, la activación de Gα_{q/11} sí se bloquea, mientras que no afecta a la activación de Gα_{i3}, lo que sugiere que este último efecto es mediado por otro receptor. En el caso de las subunidades Gα_{i2} (84,45 ± 5%, p 0,023) y Gα_o (85,14 ± 4%, p 0,045), lo que se observa es una reducción estadísticamente significativa de los valores de fijación basal, lo que sugiere un comportamiento agonista inverso sobre estas subunidades, que en ambos casos es bloqueado por O-2050.

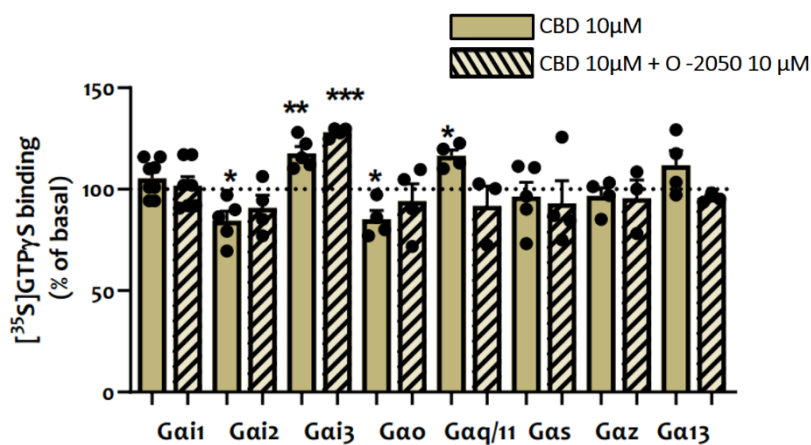


Figura 5: Efecto del CBD sobre la activación de distintas subunidades Gα. Resultados del ensayo de centelleo por proximidad del [³⁵S]GTPγS acoplado a una etapa de inmunoprecipitación con anticuerpos específicos contra cada subunidad Gα (Gα_{i1}, Gα_{i2}, Gα_{i3}, Gα_o, Gα_z, Gα_s, Gα_{q/11}, y Gα_{12/13}) en corteza cerebral humana post-mortem, incubados con CBD (10 μM), en presencia o ausencia del antagonista cannabinoide O-2050 (10 μM). Los datos se muestran como porcentaje de la fijación basal de [³⁵S]GTPγS a cada subunidad G en ausencia de compuestos. Las barras representan la media ± SEM de entre 3 y 5 experimentos realizados en triplicado. Los asteriscos representan aquellos valores que han demostrado una diferencia estadísticamente significativa respecto al 100% (One-sample t-test de Student; * p < 0,05, ** p<0,01, *** p<0,001)

Después de la caracterización del perfil de actividad del CBD sobre las diferentes subunidades Gα a una única concentración, se llevaron a cabo ensayos concentración–efecto en presencia de concentraciones crecientes de CBD (Fig.6). En estos ensayos, al igual que en los ensayos a concentración única, se observa una estimulación estadísticamente significativa de la subunidad Gα_{q/11} para la que se obtuvo una EC₅₀ de 5,2 · 10⁻⁷ M y una E_{max} de 132%. Para el resto de subunidades, a medida que aumenta la concentración de CBD se observa una disminución de la fijación de [³⁵S]GTPγS a partir de una concentración de 10⁻⁵ M provocando una reducción de entre el 15 y el 45% de la fijación basal, con una EC₅₀ entre 2·10⁻⁵ y 8·10⁻⁵ M para todas ellas.

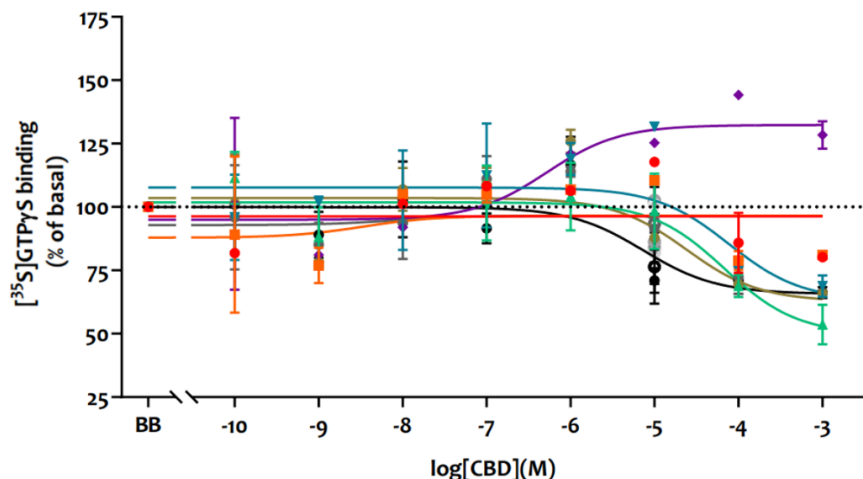


Figura 6: Efecto de concentraciones crecientes de CBD sobre la activación de las distintas subunidades Gα. Resultados del ensayo de centelleo por proximidad del [³⁵S]GTPγS acoplado a una etapa de inmunoprecipitación con anticuerpos específicos contra cada subunidad Gα (Gα_{i1}, Gα_{i2}, Gα_{i3}, Gα_o, Gα_z, Gα_s, Gα_{q/11}, y Gα_{12/13}) en corteza cerebral humana post-mortem, incubados con CBD a concentraciones de 0,1nM a 1 mM). Los datos se muestran como porcentaje de la unión basal de [³⁵S]GTPγS a cada subunidad G en ausencia de compuestos. Los puntos representan la media ± SEM de un único experimento por triplicado.

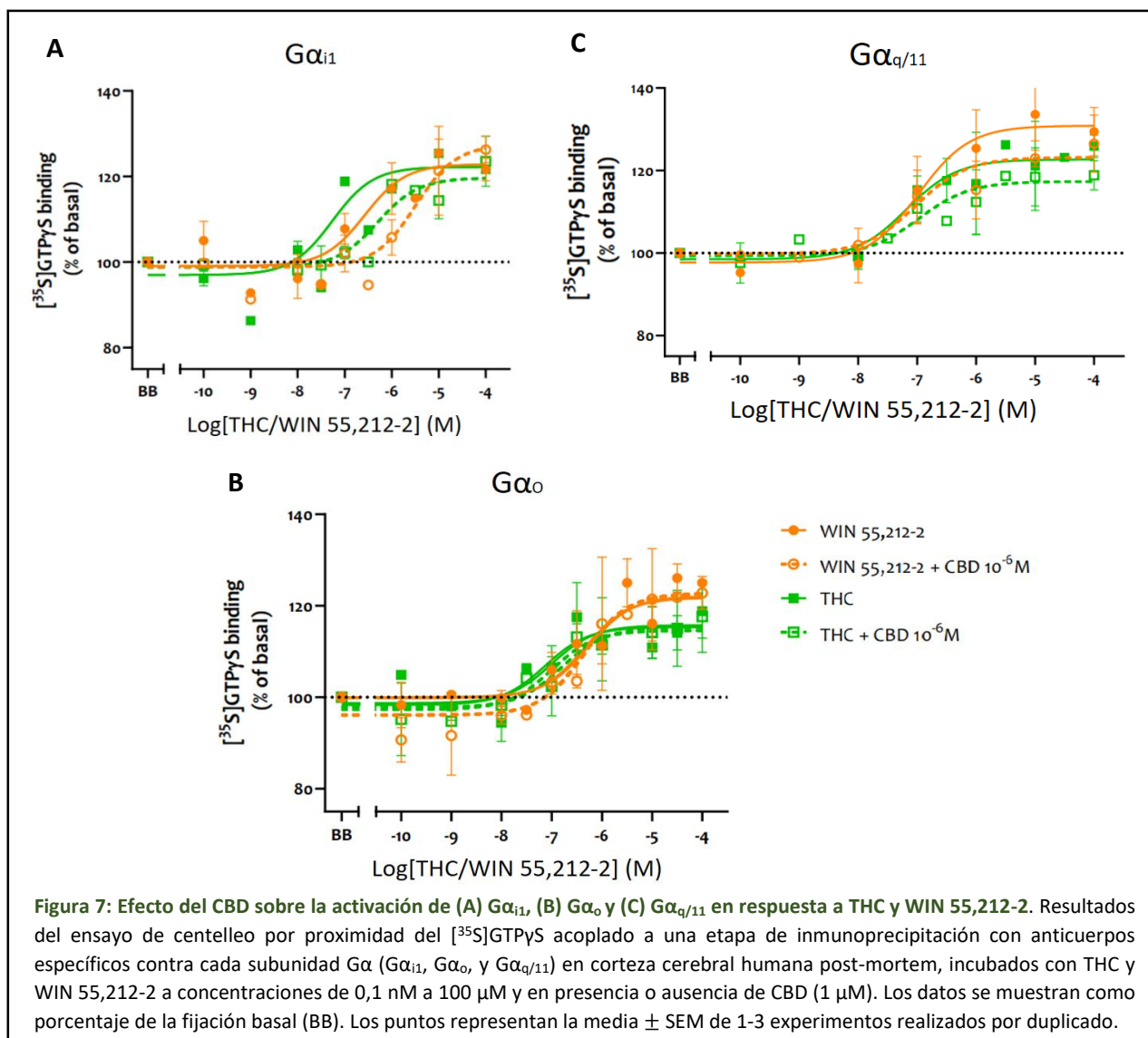
4.3. Modulación de la activación de proteínas G en respuesta a THC y WIN55212-2, por parte del CBD

Por último, se pretendía determinar el posible efecto del CBD como modulador alostérico de los receptores cannabinoide. Para ello se midió la activación de tres tipos de subunidades Gα: Gα_{i1}, Gα_o y Gα_{q/11}, en respuesta a concentraciones crecientes de THC y WIN 55,212-2 en presencia o ausencia de CBD 1 μM, concentración que se decidió en base a datos previos de la literatura [14,16]. Por otro lado, se decidió analizar Gα_{i1}, Gα_o y Gα_{q/11}, puesto que son aquellas subunidades para las que tanto THC como WIN 55,212-2 provocaron una activación estadísticamente significativa y dependiente de receptores cannabinoide. Por otro lado, el CBD ha mostrado un comportamiento diferente sobre cada una de estas subunidades, ya que no ha mostrado ningún efecto por si solo sobre Gα_{i1}, mientras se comporta como agonista inverso sobre Gα_o y como agonista sobre Gα_{q/11}.

El CBD parece no alterar significativamente el valor de activación máxima de la subunidad Gα_{i1} (Fig. 7A) (E_{max} THC = 122,2%, E_{max} THC + CBD = 119,7%; p>0,05) (E_{max} WIN 55,212-2 = 122,9%, E_{max} WIN 55,212-2 + CBD = 127,5%; p>0,05). Sin embargo, el co-análisis mediante F test de las curvas demostró

que las curvas en presencia de CBD son diferentes de las curvas en su ausencia, y que las diferencias se deben a cambios en la EC_{50} , observándose un desplazamiento de las curvas hacia la derecha tanto para el THC (EC_{50} THC = $5,4 \cdot 10^{-8}$ M, EC_{50} THC + CBD = $4,9 \cdot 10^{-7}$ M; $p < 0,001$; F (DFn, DFd) = 8,817 (1, 42)) como para el WIN 55,212-2 (EC_{50} WIN = $2,7 \cdot 10^{-7}$ M, EC_{50} WIN + CBD = $3,2 \cdot 10^{-6}$ M; $p < 0,05$; F (DFn, DFd) = 5,955 (1,45)). A diferencia de la subunidad $G\alpha_{i1}$, la activación de la subunidad $G\alpha_o$ por THC y WIN 55,212-2, no parece verse modulada por CBD (Fig. 7B).

En el caso de la subunidad $G\alpha_{q/11}$ (Fig. 7C) también se observa un efecto modulador del CBD sobre las curvas de THC y WIN 55,212-2, que en este caso no afecta a la EC_{50} (EC_{50} THC = $5,4 \cdot 10^{-8}$ M, EC_{50} THC + CBD = $4,9 \cdot 10^{-7}$ M) (EC_{50} WIN = $1,1 \cdot 10^{-7}$ M, EC_{50} WIN + CBD = $0,9 \cdot 10^{-7}$ M), si no a los valores máximos de activación de esta subunidad. Estos valores se ven reducidos para ambos fármacos en presencia de CBD 1 μ M, aunque no de manera estadísticamente significativa (E_{max} THC = 122,7%, E_{max} THC + CBD = 117,4%) (E_{max} WIN = 130,9%, E_{max} WIN + CBD = 123,2%).



5. Discusión

El sistema endocannabinoide juega un papel importante en la regulación de numerosos procesos fisiológicos tales como la neurotransmisión o la plasticidad sináptica, entre otros. Se ha visto que alteraciones en este sistema están relacionadas con trastornos neuropsiquiátricos, por lo que su modulación mediante fármacos puede suponer un gran avance en el tratamiento de estas patologías. La principal desventaja farmacológica de los compuestos que actúan sobre el sistema

endocannabinoide son sus efectos adversos, efectos para los que, de momento, se desconoce el papel de este sistema endocannabinoide u otros sistemas.

Uno de los principales componentes del sistema endocannabinoide son los receptores CB1 (más abundante en SNC) y CB2, que, como otros GPCR, presentan selectividad funcional. Esto quiere decir que, en respuesta a distintos ligandos, o debido a la acción de moduladores alostéricos, el receptor actuará preferentemente sobre una vía de señalización y no otra. Tener un mayor conocimiento sobre la selectividad funcional los receptores cannabinoides es fundamental para guiar el diseño de ligandos que, al unirse al receptor, sean capaces de activar las vías de señalización de interés terapéutico, mientras se evita activar otras vías responsables de los efectos adversos.

Hasta ahora la mayoría de trabajos que estudian la selectividad funcional del receptor CB1, evalúan parámetros tales como la producción de cAMP, la fosforilación de ERK/AKT y otros mediadores intracelulares [17,18]. Estas son determinaciones aguas abajo del receptor, que pueden haberse visto afectadas por procesos de amplificación de la señal, y que pueden estar influenciadas por la interacción entre diferentes cascadas intracelulares, etc. El presente trabajo se centra en caracterizar el primer paso en la transmisión de la señal de los GPCRs, dónde la amplificación y el crosstalk son mínimos. Para ello se ha llevado a cabo la determinación del patrón de activación de diferentes subunidades $G\alpha$ de las proteínas G heterotriméricas en respuesta a distintos ligandos cannabinoides (THC, WIN 55,212-2, HU-210 y CBD). Además, se ha intentado determinar el posible efecto modulador del CBD sobre la actividad de los otros ligandos.

5.1. Selectividad funcional de los receptores cannabinoides en respuesta a THC, WIN 55,212-2 y HU-210 en corteza cerebral humana post-mortem

En este trabajo se ha demostrado que todos los ligandos cannabinoides utilizados presentan un patrón diferencial de activación de las subunidades $G\alpha$, demostrando una vez más el fenómeno de selectividad funcional para los receptores cannabinoides en tejido cerebral. Tanto el THC, como el WIN 55,212-2 y el HU-210 son capaces de activar significativamente las subunidades $G\alpha_{i1}$ y $G\alpha_o$, tal y como se había descrito previamente [12,13]. En los tres casos, estas activaciones son bloqueadas por O-2050, por lo que se puede afirmar que es mediada por receptores cannabinoides. Teniendo en cuenta que estos tres ligandos cannabinoides son capaces de activar tanto las subunidades $G\alpha_{i1}$ como $G\alpha_o$, lo cual no ocurre con las subunidades $G\alpha_{i2}$ y $G\alpha_{i3}$, podemos pensar que son alguna de las primeras las implicadas en el mecanismo de inhibición retrograda de la neurotransmisión.

Pese a que el mecanismo mejor descrito de señalización mediada por el receptor CB1 es la activación de subunidades $G\alpha_{i/o}$, se ha demostrado que diferentes ligandos cannabinoides también pueden inducir la interacción del receptor con otro tipo de subunidades $G\alpha$. Por ejemplo, tanto el THC como el WIN 55,212-2 son capaces de activar significativamente la subunidad $G\alpha_{q/11}$. Este tipo de subunidad $G\alpha$, es muy abundante en SNC y está implicada en la activación de la PLC y fosforilación de proteínas de la vía MAPK [12,22]. Se ha propuesto que el acoplamiento del receptor CB1 a esta subunidad $G\alpha$ se produce en células gliales, donde la proporción $G\alpha_{i/o}/G\alpha_{q/11}$ favorece la interacción con esta última, y donde media la liberación de gliotransmisores que participan en procesos como la formación de la memoria [8,11]. En trabajos anteriores se había demostrado que WIN 55,212-2 es capaz de activar subunidades $G\alpha_{q/11}$ [12,22], sin embargo, se habían obtenido resultados contradictorios respecto al THC [12,22]. Destacar que los estudios en los que no se detectó activación de $G\alpha_{q/11}$, por parte del THC, fueron realizados en células HEK transfectadas con el receptor CB1, donde las condiciones celulares pueden no ser las mismas que en las células gliales [22], mientras que los estudios en los que, sí se detectó activación, así como en este mismo trabajo, se realizaron en membranas de corteza cerebral, donde hay presentes células gliales [12]. Este hecho refuerza la hipótesis de que el tipo celular y la localización subcelular del receptor, donde la relación $G\alpha_{i/o}/G\alpha_{q/11}$, entre otras, puede ser diferente, es esencial para favorecer la interacción de CB1 con $G\alpha_{q/11}$. Además, estos datos apoyarían también la hipótesis de que la preferencia de la señalización a través de una u otra $G\alpha$ en respuesta al THC depende del tipo celular en el que se exprese el receptor.

Por su parte HU-210 también mostró una activación significativa de $G\alpha_{q/11}$, sin embargo, esta no fue bloqueada por O-2050, por lo que no es mediada por receptores cannabinoides. Esto es importante, puesto que demuestra que un ligando que es estructuralmente análogo del THC, es capaz de activar un receptor que este no reconoce, lo que podría dar lugar a nuevas aplicaciones terapéuticas de ligandos cannabinoides actuando sobre receptores distintos de CB1/CB2.

Numerosos estudios han obtenido resultados contradictorios respecto a la señalización a través de proteínas $G\alpha_s$ en respuesta a la activación de CB1 [11,12,22]. Aquellos que muestran que ligandos como HU-210 y WIN 55,212-2 pueden activar subunidades $G\alpha_s$ de forma dependiente de CB1 han sido realizados en células transfectadas con el receptor [22], mientras que no ha podido detectarse este efecto en ensayos realizados en membranas de corteza cerebral [12]. En nuestro caso sí se observa una cierta activación de $G\alpha_s$ en respuesta a WIN 55,212-2, no obstante, no se observa activación en respuesta a THC ni a HU-210, sugiriendo que los datos contradictorios previos también podrían deberse a diferencias en los ligandos utilizados y a la selectividad funcional del receptor.

Las subunidades $G\alpha_z$ se encuentran principalmente en células neurales y neuroendocrinas [12]. En estudios anteriores se había demostrado que tanto THC como WIN 55,212-2 podían activar subunidades $G\alpha_z$ [12], sin embargo, en el presente trabajo, esta subunidad fue activada únicamente por WIN 55,212-2, mientras que ni THC ni HU-210 presentan actividad sobre esta. Esta diferencia se puede deber a que los estudios anteriores fueron realizados en corteza cerebral de rata, cuyas condiciones celulares pueden no corresponderse con aquellas de la corteza cerebral humana.

Finalmente, la última subunidad $G\alpha$ estudiada fue la subunidad $G\alpha_{12/13}$. Estudios anteriores habían demostrado la interacción entre $G\alpha_{12/13}$ y receptores cannabinoides, más concretamente CB2 [12]. En este trabajo, no solo se vuelve a encontrar una activación de $G\alpha_{12/13}$ por parte del WIN 55,212-2, sino también del THC. Mientras el efecto del THC si es bloqueado en presencia de O-2050, en el caso de WIN 55,212-2 la activación no es bloqueada por el antagonista cannabinoide, lo que sugiere que podría estar participando un receptor distinto de CB1/CB2.

Resumiendo, cabría mencionar que todos los efectos observados para el THC fueron bloqueados por O-2050 indicando que, en corteza cerebral humana, el THC solo es capaz de activar las proteínas G a través receptores cannabinoides, independientemente de que pudiera mostrar o no afinidad por otras proteínas/receptores diana.

También es importante el hecho de que tanto ligandos estructuralmente distintos, como el WIN 55,212-2 y el THC, como ligandos estructuralmente similares como el THC y el HU-210, presentan un perfil diferente de activación de las proteínas G, lo que apoya el hecho de que ligeras variaciones en la estructura del ligando pueden suponer diferencias importantes en cuanto a la selectividad funcional. Estas pequeñas variaciones estructurales podrían ser aprovechadas en clínica para la optimización de fármacos cannabinoides que no presenten efectos secundarios, una vez se haya podido describir la relación entre los diferentes efectos moleculares y el perfil de usos terapéuticos y efectos adversos.

5.2.CBD: Selectividad funcional y modulación alostérica

Los presentes resultados demuestran que el CBD interacciona con los receptores cannabinoides mostrando actividad propia, y actuando como modulador alostérico del efecto de otros ligandos de estos receptores.

Anteriormente se había propuesto que el CBD no es un agonista cannabinoide, sino un modulador alostérico de estos receptores [16]. En este estudio, el CBD ha demostrado actividad como agonista cannabinoide activando $G\alpha_{q/11}$, y como agonista inverso inhibiendo la fijación basal de $G\alpha_{i2}$ y $G\alpha_o$. Dado que el antagonista utilizado en los experimentos, O-2050, no es selectivo entre los receptores CB1 y CB2, estos efectos del CBD podrían deberse tanto a su interacción con el receptor CB1 como con el CB2 para el que datos previos de la literatura sugieren que el CBD se comporta como agonista inverso [23].

Por otro lado, el CBD es capaz de activar la subunidad $G\alpha_{i3}$, un efecto que no fue bloqueado por O-2050, lo que indica que no es mediado por receptores cannabinoides. Es posible que este efecto se deba a la interacción del CBD con otros GPCRs por los que se ha descrito que presenta buena afinidad y que se

acoplan a $G\alpha_{i/o}$ como $5HT_{1A}$, $A_{2A}R$ o $GPR55$ [2]. Lo que no se conoce a día de hoy, es si este efecto podría tener que ver o no con los efectos terapéuticos descritos para el CBD [2,5], algo que merecería futuros estudios.

Se comprobó también la activación de las distintas subunidades $G\alpha$ en respuesta a concentraciones crecientes de CBD. En estos ensayos no se observa ningún efecto significativo hasta concentraciones superiores a 10^{-5} M, cuando se aprecia una reducción de la actividad en las subunidades $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_o$, $G\alpha_z$ y $G\alpha_s$, mientras $G\alpha_{q/11}$, que sufre una activación. Estos resultados no se corresponden completamente con lo observado a una concentración $10 \mu M$ de CBD. Estas discrepancias se pueden deber a que los datos de las curvas concentración-efecto de CBD que se muestran en este trabajo provienen de un único experimento en el que además no se antagonizó el efecto con O-2050, por lo que no podemos determinar que los efectos de activación o inhibición de estas subunidades $G\alpha$ sea mediada por receptores cannabinoides. De todos modos, y aunque sea de forma preliminar, estos resultados refuerzan la idea de la selectividad funcional del CBD así como su efecto agonista o agonista inverso específico sobre algunos subtipos de subunidades $G\alpha$.

Además de los efectos como agonista o agonista inverso cannabinoide observados para el CBD, también se había planteado que el CBD actuase como modulador alostérico de otros ligandos cannabinoides [16]. En este estudio se ha visto como el CBD sí presenta un efecto modulador alostérico negativo en la activación de $G\alpha_{i1}$, tanto por THC como por WIN 55,212-2, aumentando en ambos casos la EC_{50} . Del mismo modo, y aunque no de manera significativa, el CBD también parece afectar negativamente a la activación de $G\alpha_{q/11}$ por THC y WIN 55,212-2. En este caso lo que se observa es una reducción del efecto máximo, quizás asociada al efecto agonista inverso del CBD sobre esta subunidad. Por otro lado, el CBD no pareció tener ningún efecto sobre la activación de la subunidad $G\alpha_o$, lo que demuestra que el CBD no solo presenta selectividad funcional cuando actúa como agonista cannabinoide sino también cuando lo hace como modulador alostérico.

Este perfil funcional del CBD lo hace muy interesante como objetivo para futuros estudios sobre su posible utilidad terapéutica, tanto en monoterapia, como administrado junto con otros fármacos cannabinoides para mejorar su perfil de efectos adversos, algo que ya se ha descrito para el THC cuando se administra junto con CBD [24].

6. Conclusiones

En este trabajo se ha demostrado de nuevo cómo los receptores cannabinoides cerebrales presentan selectividad funcional en respuesta a diversos ligandos cannabinoides, tanto fitocannabinoides (THC) como sintéticos (WIN 55,212-2) y HU-210. Del mismo modo se ha demostrado que el CBD sí interacciona con los receptores cannabinoides, sobre los que también presenta selectividad funcional, actuando como un agonista clásico ($G\alpha_{q/11}$) o un agonista inverso ($G\alpha_{i2}$ y $G\alpha_o$) según la subunidad $G\alpha$ estudiada. Además, se ha demostrado que el CBD también actúa como modulador alostérico de la funcionalidad de otros ligandos cannabinoides, y que este efecto es diferente dependiendo del subtipo de subunidad $G\alpha$.

Los resultados de este trabajo describen el complejo y diverso perfil funcional de los diferentes ligandos cannabinoides, especialmente el CBD, y pone de manifiesto la necesidad de más estudios que permitan desarrollar todo su potencial terapéutico para el tratamiento de diversos trastornos neuropsiquiátricos. Así, estos estudios a nivel bioquímico deberán ser complementados con estudios *in vivo* y ensayos comportamentales para determinar el verdadero efecto de la activación selectiva de diferentes funciones mediadas por receptores cannabinoides.

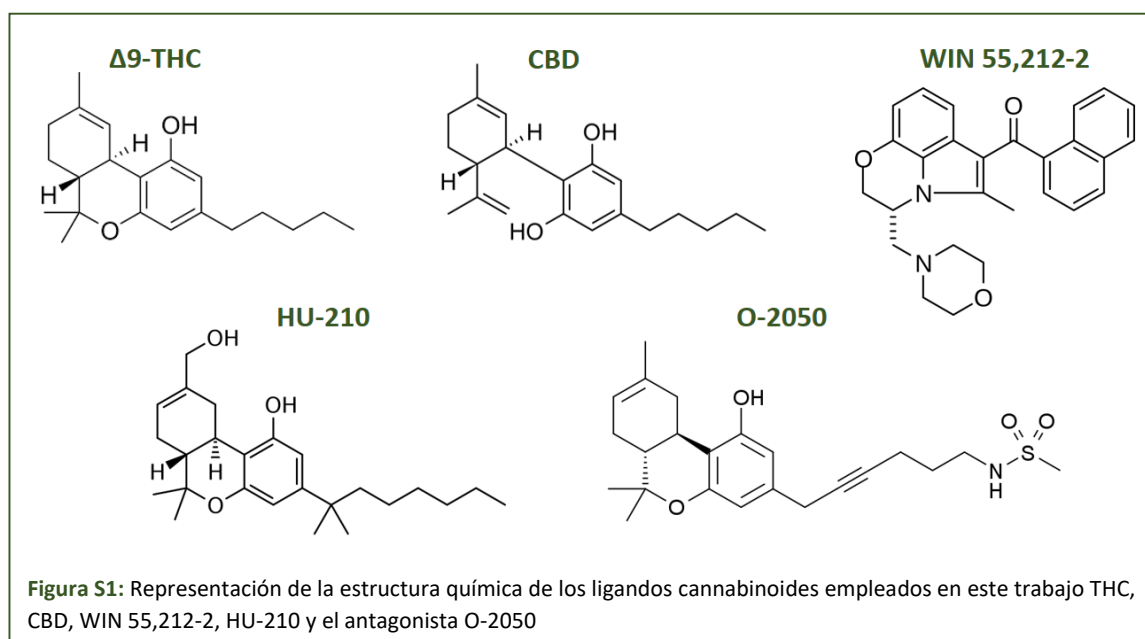
7. Bibliografía

1. Amin, M.R. & Ali, D.W. (2019). Pharmacology of Medical Cannabis. In: Bukiya, A. (eds) Recent Advances in Cannabinoid Physiology and Pathology. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 1162. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21737-2_8
2. Almeida, D. L., & Devi, L. A. (2020). Diversity of molecular targets and signaling pathways for CBD. Pharmacology Research & Perspectives, 8(6). <https://doi.org/10.1002/prp2.682>

3. Keimpema, E., di Marzo, V., & Harkany, T. (2021). Biological basis of cannabinoid medicines. *Science*, 374(6574), 1449–1450. <https://doi.org/10.1126/science.abf6099>
4. Leweke, F. M., Mueller, J. K., Lange, B., Fritze, S., Topor, C. E., Koethe, D., & Rohleder, C. (2018). Role of the Endocannabinoid System in the Pathophysiology of Schizophrenia: Implications for Pharmacological Intervention. *CNS Drugs*, 32(7), 605–619. <https://doi.org/10.1007/s40263-018-0539-z>
5. Silvestro, S., Schepici, G., Bramanti, P., & Mazzon, E. (2020). Molecular Targets of Cannabidiol in Experimental Models of Neurological Disease. *Molecules*, 25(21), 5186. <https://doi.org/10.3390/molecules25215186>
6. Dos Santos RG, Hallak JEC & Crippa JAS. Neuropharmacological Effects of the Main Phytocannabinoids: A Narrative Review. *Adv Exp Med Biol*. 2021;1264:29-45. https://doi.org/10.1007/978-3-030-57369-0_3.
7. Cristino, L., Bisogno, T., & di Marzo, V. (2019). Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nature Reviews Neurology*, 16(1), 9–29. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0284-z>
8. Busquets-Garcia, A., Bains, J., & Marsicano, G. (2018). CB1 Receptor Signaling in the Brain: Extracting Specificity from Ubiquity. *Neuropsychopharmacology*, 43(1), 4–20. <https://doi.org/10.1038/npp.2017.206>
9. Ibsen, M. S., Connor, M., & Glass, M. (2017). Cannabinoid CB₁ and CB₂ Receptor Signaling and Bias. *Cannabis and cannabinoid research*, 2(1), 48–60. <https://doi.org/10.1089/can.2016.0037>
10. Manning, J. J., Green, H. M., Glass, M., & Finlay, D. B. (2021). Pharmacological selection of cannabinoid receptor effectors: Signalling, allosteric modulation and bias. *Neuropharmacology*, 193, 108611. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108611>
11. Leo, L. M., & Abood, M. E. (2021). CB1 Cannabinoid Receptor Signaling and Biased Signaling. *Molecules*, 26(17), 5413. <https://doi.org/10.3390/molecules26175413>
12. Diez-Alarcia, R., Ibarra-Lecue, I., Lopez-Cardona, N. P., Meana, J., Gutierrez-Adán, A., Callado, L. F., Agirregoitia, E., & Urigüen, L. (2016). Biased Agonism of Three Different Cannabinoid Receptor Agonists in Mouse Brain Cortex. *Frontiers in Pharmacology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00415>
13. Galve-Roperh, I., Aguado, T., Palazuelos, J., & Guzman, M. (2008). Mechanisms of Control of Neuron Survival by the Endocannabinoid System. *Current Pharmaceutical Design*, 14(23), 2279–2288. <https://doi.org/10.2174/138161208785740117>
14. Lu, D., Immadi, S. S., Wu, Z., & Kendall, D. A. (2018). Translational potential of allosteric modulators targeting the cannabinoid CB1 receptor. *Acta Pharmacologica Sinica*, 40(3), 324–335. <https://doi.org/10.1038/s41401-018-0164-x>
15. Sylantsev, S., Jensen, T. P., Ross, R. A., & Rusakov, D. A. (2013). Cannabinoid- and lysophosphatidylinositol-sensitive receptor GPR55 boosts neurotransmitter release at central synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(13), 5193–5198. <https://doi.org/10.1073/pnas.1211204110>
16. Laprairie, R. B., Bagher, A. M., Kelly, M. E. M., & Denovan-Wright, E. M. (2015). Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB₁ receptor. *British Journal of Pharmacology*, 172(20), 4790–4805. <https://doi.org/10.1111/bph.13250>
17. Priestley, R., Glass, M., & Kendall, D. (2017). Functional Selectivity at Cannabinoid Receptors. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)*, 80, 207–221. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.03.005>
18. Khajehali, E., Malone, D. T., Glass, M., Sexton, P. M., Christopoulos, A., & Leach, K. (2015). Biased Agonism and Biased Allosteric Modulation at the CB1 Cannabinoid Receptor. *Molecular pharmacology*, 88(2), 368–379. <https://doi.org/10.1124/mol.115.099192>
19. O'Sullivan, S. E. (2016) An update on PPAR activation by cannabinoids. *British Journal of Pharmacology*, 173: 1899–1910. doi: [10.1111/bph.13497](https://doi.org/10.1111/bph.13497).
20. Compton, D. R., Gold, L. H., Ward, S. J., Balster, R. L., & Martin, B. R. (1992). Aminoalkylindole analogs: cannabimimetic activity of a class of compounds structurally distinct from delta 9-tetrahydrocannabinol. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 263(3), 1118–1126.
21. Priestley, R., Glass, M., & Kendall, D. (2017). Functional Selectivity at Cannabinoid Receptors. *Cannabinoid Pharmacology*, 207–221. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.03.005>
22. Lauckner, J. E., Hille, B., & Mackie, K. (2005). The cannabinoid agonist WIN55,212-2 increases intracellular calcium via CB₁ receptor coupling to G_{q/11} G proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(52), 19144–19149. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509588102>
23. Thomas, A., Baillie, G. L., Phillips, A. M., Razdan, R. K., Ross, R. A., & Pertwee, R. G. (2007). Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. *British journal of pharmacology*, 150(5), 613–623. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707133>
24. McPartland, J. M., & Russo, E. B. (2014). Non-phytocannabinoid constituents of cannabis and herbal synergy. *Handbook of cannabis*, 280–295.

8. Anexos e información complementaria

8.1. Anexo 1: Estructura de los ligandos cannabinoides



8.2. Anexo 2: Composición de las disoluciones empleadas

Disolución	Composición
Tampón de Homogeneización	50 mM Tris-HCl, 1 mM EGTA, 3 mM MgCl ₂ y 1 mM DTT, 250 mM Sacarosa, pH 7,4
Tampón de Centrifugación	50 mM Tris-HCl, 1 mM EGTA, 3 mM MgCl ₂ y 1 mM DTT, pH 7,4
Tampón de Incubación	50 mM Tris-HCl, 1 mM EGTA, 3 mM MgCl ₂ , 0.2 mM DTT, 100 mM NaCl, pH 7,4
Tampón E	10mM Tricina NaOH, 10 mM DTT, pH7,7

Tabla S1: Composición de las disoluciones empleadas en la preparación de membranas y *Antibody-Capture* [³⁵S]GTPγS *Scintillation Proximity Assay*

8.3. Anexo 3: Anticuerpos y concentraciones de GDP empleadas en centelleo por proximidad del [³⁵S]GTPγS

Diana	Descripción	Mw Esperado	Casa comercial	Catalogo #	[GDP] (μM)	Dilución Ab SPA
Gα _{i1}	Mouse monoclonal anti-Gα _{i1}	41 kDa	Santa Cruz	sc-56536	100	1:20
Gα _{i2}	Mouse monoclonal anti-Gα _{i2}	41 kDa	Santa Cruz	sc-13534	50	1:20
Gα _{i3}	Mouse monoclonal anti-Gα _{i3}	41 kDa	Santa Cruz	sc-365422	100	1:30
Gα _{i3}	Rabbit polyclonal anti-Gα _{i3}	41 kDa	<i>Antibodies on-line</i>	ABIN6258933	100	1:60
Gα _o	Mouse monoclonal anti-Gα _o	40 kDa	Santa Cruz	sc-393874	50	1:40
Gα _{q/11}	Mouse monoclonal anti-Gα _{q/11}	40-41 kDa	Santa Cruz	sc-515689	10-50	1:20
Gα _s	Mouse monoclonal anti-Gα _s	45-52 kDa	Santa Cruz	sc-377435	100	1:20
Gα _z	Rabbit polyclonal anti-Gα _z	34 kDa	<i>Antibodies on-line</i>	ABIN653561	100	1:20
Gα _{12/13}	Rabbit polyclonal anti-Gα _{12/13}	40 kDa	<i>Antibodies on-line</i>	ABIN1537979	100	1:20

Tabla S2: Anticuerpos y concentraciones de GDP empleadas en los ensayos de centelleo por proximidad del [³⁵S]GTPγS

8.4. Anexo 4: Protocolo de centelleo por proximidad del [³⁵S]GTPγS acoplado a una etapa de inmunoprecipitación.

	Condiciones experimentales				[³⁵ S]final
	BB	Fármaco	Fármaco + O2050/CBD	NSB	
GDP	12 μl	12 μl	12 μl	12 μl	10/50/100 μM
Vehículo	24 μl	12 μl	-----	12 μl	
GTPγS	-----	-----	-----	12 μl	100 μM
Antagonista (O2050) / CBD	-----	-----	12 μl	-----	10 μM
Membranas	160 μl	160 μl	160 μl	160 μl	11 μg
Incubación 15' 30°C y agitación 400 rpm					
Fármaco	-----	12 μl	12 μl	-----	10 μM
Incubación 30' 30°C y agitación 400 rpm					
[³⁵ S]GTPγS	5 μl	5 μl	5 μl	5 μl	0,4 nM
Incubación 1 h 30' 30°C y agitación 450 rpm					
Detergentes	20 μl	20 μl	20 μl	20 μl	
Incubación 30' 22°C y agitación 350 rpm					
Anticuerpo en BSA 15%	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl	
Incubación 1 h 30' 22°C y agitación 350 rpm					
PVT Protein A SPA Beads	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl	0,75 mg
Incubación 3 h 22°C y agitación 350 rpm					
Seal Plate					
Centrifugar 8' 3000 rpm y cuantificar					
Tabla S3: Protocolo de un ensayo de centelleo por proximidad del [³⁵ S]GTPγS acoplado a una etapa de inmunoprecipitación. Se describen el orden de adición de los compuestos en cada condición, así como el volumen que se añade y la concentración final en el pocillo. Se describen también la duración y condiciones de cada etapa de incubación					