



Cribado farmacológico de moléculas sintéticas con afinidad por receptores CB₁ para su aplicabilidad en la enfermedad del Alzheimer

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Farmacia / Quinto Curso

Gorka Pereira Castelo

Resumen

El sistema cannabinoide es un sistema de neurotransmisión y neuromodulación de base lipídica, la cual se encuentra alterada en distintas enfermedades neurodegenerativas como en la enfermedad del Alzheimer (EA). Se estudian 12 nuevas moléculas de síntesis cuya estructura molecular está basada en el agonista cannabinoide WIN55,212-2. Utilizando las membranas celulares de la corteza cerebral de ratas Sprague-Dawley, se determina la afinidad de cada una de las moléculas por el receptor endocannabinoide CB₁ mediante el desplazamiento de la unión de una molécula con afinidad conocida por estos receptores, [³H]CP55940. Del mismo modo, utilizando membranas de células que sobreexpresan receptores endocannabinoides CB₁, se observa la afinidad específica de las moléculas por el sitio de unión. Posteriormente, el estudio de la actividad del receptor se realiza por medio de ensayos de actividad medida por la unión de [³⁵S]GTPγS. Por un lado, en el ensayo del desplazamiento del [³H]CP55940, de las 12 moléculas estudiadas, una parece presentar resultados satisfactorios. Por otro lado, en el ensayo del acople funcional de [³⁵S]GTPγS, el resultado de dicha molécula es discutible. Este trabajo será el punto de partida para la búsqueda de un nuevo tratamiento para la EA.

Índice

Introducción	1
La implicación de los lípidos en la EA.....	1
Sistema endocannabinoide	2
Molécula origen: WIN55,212-2 fármaco agonista CB ₁	3
Nuevas moléculas de síntesis	4
Objetivos	4
Materiales	4
Reactivos	4
Cultivos celulares	5
Muestras de tejido de rata	5
Métodos	5
Extracción de los tejidos	5
Obtención de las membranas.....	6
Desplazamiento de la unión de [³ H]CP55940 con moléculas de nueva síntesis	6
Ensayo de acople funcional de [³⁵ S]GTPγS.....	7
Resultados y Discusión	10
Desplazamiento de la unión de [³ H]CP55940 con nuevas moléculas de síntesis en membranas de corteza cerebral de rata.	10
Desplazamiento de la unión de [³ H]CP55940 con UVI3502 en membranas de células que sobreexpresan receptores CB ₁	14
Ensayo de acople funcional de [³⁵ S]GTPγS.....	17
Conclusiones	19
Bibliografía	20

Introducción

La implicación de los lípidos en la EA

La enfermedad del Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa que produce un daño neuronal progresivo que se caracteriza por una pérdida de la memoria a corto y a largo plazo¹. Esta altera tanto la conducta como la habilidad cognitiva, generando un deterioro en la calidad de vida y en la autosuficiencia de los que la padecen, llegando incluso a producir la muerte¹. Es la demencia más común en el mundo¹, con un total de 800.000 pacientes en España y 40.000 nuevos casos anuales estimados².

Desde su descripción en el año 1906, la investigación puso su atención y esfuerzos en el estudio de las proteínas que se ven alteradas en esta enfermedad, principalmente los acúmulos de beta-amiloide y ovillos neurofibrilares, compuestos de la proteína tau hiperfosforilada que se creían la causa del daño neuronal y de la neuroinflamación característicos de la enfermedad³. Hoy en día la importancia de estas proteínas se encuentra en entredicho, ya que la aparición de estas estructuras no se correlaciona de una manera directa con la enfermedad, su presencia no siempre está ligada a la enfermedad o su ausencia a un estado de buena salud³.

En la actualidad el conocimiento de la EA es muy limitado y no se dispone de un tratamiento efectivo para tratar de atajar la enfermedad. Los tratamientos actuales, que únicamente son útiles para paliar ciertos síntomas de la EA, son antagonistas glutamatérgicos como la memantina¹ o anticolinesterásicos como la rivastigmina, donepezilo o la galantamina¹. La función principal de éstos últimos consiste en aumentar los niveles de acetilcolina en el sistema nervioso central (SNC), los cuales se encuentran disminuidos debido al deterioro neuronal¹. Su efecto, no obstante, solo retrasa el progreso de la enfermedad y no recupera el nivel cognitivo¹. Por lo tanto, es necesaria la búsqueda de un tratamiento alternativo efectivo, que produzca un menor número de efectos adversos y que tenga la capacidad de recuperar, al menos en parte, la capacidad cognitiva. Es por ello que es estrictamente necesaria la investigación desde ópticas diferentes.

Si anteriormente se ha hecho referencia a la investigación focalizada en los acúmulos de proteínas aberrantes, en los últimos años se ha comenzado a explorar otro grupo molecular muy amplio, cuya alteración a causa de la enfermedad se ha descrito: los lípidos. Los lípidos se conocen comúnmente por sus funciones energéticas, reguladoras y estructurales.

Aproximadamente un 50-60% de todo el peso seco del sistema nervioso central (SNC) es de base lipídica, siendo el colesterol el lípido más abundante⁴. En el SNC, los lípidos juegan un papel imprescindible, pues, entre otras funciones, forman las vainas de mielina que permiten la transmisión de las despolarizaciones de los axones neuronales⁵ y forman parte de diversos sistemas de neurotransmisión como en el sistema endocannabinoide.

Sistema endocannabinoide

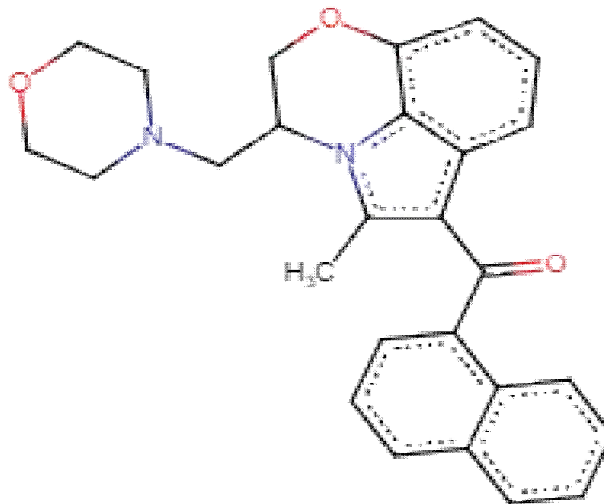
El sistema endocannabinoide es un sistema de señalización de base lipídica presente en todo el organismo. Su alteración ha sido descrita en diversas enfermedades y relacionada con procesos neurodegenerativos, neuroinflamatorios, síndromes metabólicos y psiquiátricos⁶. El sistema endocannabinoide ejerce efectos neuromoduladores frente a otros sistemas de neurotransmisión como el sistema colinérgico o el sistema dopaminérgico, siendo estos sistemas los que se encuentran alterados en las enfermedades neurodegenerativas del Alzheimer y el Parkinson respectivamente^{7,8}. Esto indica que la actuación farmacológica sobre el sistema endocannabinoide podría actuar en beneficio del tratamiento de estas enfermedades.

El sistema endocannabinoide se compone de varios receptores, siendo 2 los más importantes y estudiados, los receptores CB₁ y CB₂^{9,10}. Además, existen otros receptores que han sido ubicados en torno a los receptores endocannabinoides, putativos, los receptores GPR55^{9,10}. En el SNC, se encuentran primordialmente los receptores CB₁ y GPR55, mientras que el receptor CB₂ se encuentra mayoritariamente en sistema nervioso periférico⁹. Por un lado, los receptores CB₁ y CB₂ son receptores acoplados a proteína G_{i/o}, siendo la anandamida y el 2-araquidonilglicerol sus ligandos endógenos principales^{10,11}. Por otro lado, el receptor GPR55 es un receptor acoplado a proteína G₁₃ y, en menor medida, G₁₂ y G_q, cuyo ligando endógeno principal es el lípido fosfatidilinositol (LPI)¹².

Debido a la alteración de este sistema y de la importancia general de los lípidos en el SNC, es necesario el estudio de los lípidos para el completo entendimiento tanto de la enfermedad como del funcionamiento global del SNC y la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas para las distintas enfermedades neurodegenerativas.

Molécula origen: WIN55,212-2 fármaco agonista CB₁

La molécula WIN55,212-2, es una molécula de origen sintético y de base lipídica (*Figura 1*). Tiene la capacidad de unirse y activar los receptores endocannabinoides CB₁ y CB₂^{13,14}. Debido al agonismo del receptor endocannabinoide CB₁ se ha convertido en una molécula de interés para la búsqueda de tratamientos de diversas enfermedades neurodegenerativas como la EA. Sin embargo, el tratamiento de WIN55,212-2 produce una serie de efectos psicoactivos indeseados: la hipolocomoción, la hipotermia, la catalepsia y la analgesia son los efectos más descritos¹⁵.



- **Figura 1:** estructura química de la molécula WIN55,212-2. Adquirido desde la web IUPHAR¹³ -

Por lo tanto, la molécula WIN55,212-2 podría suponer un tratamiento eficaz frente a la EA; no obstante, debido a sus efectos indeseados, el tratamiento con WIN55,212-2 conlleva muchos inconvenientes en el día a día de los pacientes. Por esa razón, sería interesante encontrar una molécula similar a la molécula WIN55,212-2 que conserve tanto la afinidad como la eficacia frente al receptor endocannabinoide CB₁ evitando, a su vez, el efecto psicoactivo.

Nuevas moléculas de síntesis

En este estudio se van a ensayar 12 nuevas moléculas de síntesis cuya estructura molecular se basa en la estructura molecular de la molécula WIN55,212-2. En el presente trabajo se realizará un cribado de dichas moléculas para observar cuáles de éstas presentan afinidad por el receptor CB₁ y, si una vez unidas, provocan la activación de dicho receptor. De este modo, podrá darse un primer paso para la búsqueda de un nuevo tratamiento efectivo frente a la EA basado en moléculas cannabinoides.

Objetivos

- Analizar la afinidad por el receptor CB₁ de las moléculas objeto de estudio.
- Estudiar la actividad del receptor CB₁ producida por las moléculas objeto de estudio.

Materiales

Reactivos

La ketamina, la xilacina, el sigmacote®, los filtros de microfibra de vidrio Whatman® GF/C, el ditioneitol (DTT), la guanosina-5'-O-3-tiotrifosfato (GTPγS) y la albúmina de suero bovino (BSA) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). La guanosina-5'-difosfato (GDP) se adquirió de Jena Bioscience GmbH (Jena, Germany). Tanto el líquido de centelleo Ultima Gold, como el ligando marcado [³H]CP55940 utilizado en el ensayo del desplazamiento de CP55940, como el GTPγ³⁵S utilizado en el ensayo de autorradiografía del acople funcional de GTPγ³⁵S fueron adquiridos de PerkinElmer (Boston, MA, USA). Las doce nuevas moléculas de síntesis objeto de estudio UVI3501, UVI3502, UVI3503, UVI3504, UVI3505, UVI3506, UVI3507, UVI3508, UVI3510, UVI3511 y UVI8113 fueron obtenidas gracias a la colaboración establecida con el Departamento de Química Orgánica de la universidad de Vigo. El antagonista cannabinoide específico CB₁ SR141716A y el antagonista específico de CB₂ SR14428 fueron adquiridos de Tocris Bioscience (Bristol, UK).

Cultivos celulares

El ensayo de desplazamiento de CP55940 fue realizado en membranas celulares tipo CHEM-1 de células que sobreexpresan el receptor CB₁ así como en cultivos celulares control, sin sobreexpresión de ningún receptor. Ambas líneas celulares fueron adquiridas de la empresa Merck KGaA.

Muestras de tejido de rata

Por otro lado, para la obtención de los tejidos biológicos, se emplearon ratas macho Sprague-Dawley de un peso que osciló entre 250 y 300 g procedentes del animalario de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU). Los animales se mantuvieron en condiciones óptimas de luz, temperatura y humedad, recibiendo alimento *ad libitum*. Los protocolos de estabulación e investigación se llevaron a cabo según las recomendaciones aprobadas por el Comité Ético de la Facultad de Medicina y Enfermería de la UPV/EHU que siguen las directrices internacionales de uso de animales de experimentación (2003/665/CE) y la legalidad vigente española (RD 1201/2005).

Métodos

Extracción de los tejidos

Para la preparación de las membranas se utilizaron ratas Sprague-Dawley (250-300g). Tras la correcta sedación de los animales empleando ketamina/xilacina (90%/10%, respectivamente) fueron decapitados. Se diseccionó el cerebro del animal y se extrajeron sus distintas áreas (núcleo estriado, hipocampo, prosencéfalo basal, hipotálamo, corteza cerebral, bulbos raquídeos, cerebelo y tronco del encéfalo), las cuales fueron rápidamente congeladas a -80°C hasta su utilización.

Obtención de las membranas

El proceso de obtención de las membranas comienza por la disolución y la homogeneización de la corteza cerebral de rata extraída previamente. Para ello, la muestra se diluye en el tampón hipertónico con el fin de ir provocando un choque osmótico en las células, permitiendo iniciar la separación de la membrana con el resto de sus orgánulos. Posteriormente, la disolución se homogeneiza gracias a un homogeneizador, un Potter y se distribuye el líquido en distintos tubos Eppendorf. Tras la homogeneización los tubos se dejan en reposo para que el choque osmótico finalice. Se procede a una centrifugación a bajas revoluciones (Sorvall RC5C), ya que una centrifugación de 5 minutos a 1.500 rpm a 4°C de la muestra homogeneizada dispondrá los orgánulos en la masa sólida del fondo (pellet), mientras que en el sobrenadante se encontrarán las membranas al ser más ligeras. Finalmente, se extrae todo el sobrenadante y se procede a realizar una segunda centrifugación de 15 minutos a 14.000 rpm a 4°C, cuyo objetivo consiste en separar las membranas de restos de menor peso, como proteínas plasmáticas. Una vez desechado el sobrenadante, se obtienen las alícuotas de membrana en los pellets de los tubos Eppendorf.

Desplazamiento de la unión de [³H]CP55940 con moléculas de nueva síntesis

Se estudia el desplazamiento de agonista cannabinoide CP55940 tanto en membranas como en células que sobreexpresan receptor CB₁. Por un lado, las membranas de cada alícuota se resuspenden en el tampón de incubación (EDTA 1 mM, MgCl₂ 3 mM, Tris-HCl 50 mM y BSA 1%; pH 7.4), obteniendo una concentración de membrana inicial de 0,85 mg/mL. La concentración final de las membranas en todas las condiciones a desarrollar será de 0,1 mg/mL. Por otro lado, las células cuya concentración inicial es de 2 mg/mL, se va a acondicionar en cada condición a una concentración de 0,02 mg/mL. Para cada uno de los fármacos a estudiar, se utilizan condiciones con concentraciones crecientes del fármaco, siendo la concentración de 10⁻¹² M la más baja y 10⁻⁴ M la más alta. Además, es necesaria la preparación de condiciones en ausencia de fármacos y condiciones en presencia del antagonista específico de los receptores CB₁ SR141716A a una concentración de 10⁻⁴ M para definir los valores totales y no específicos respectivamente. Todas las condiciones experimentales contienen una concentración de 5 nM de [³H]CP55940 y se realizan como mínimo por duplicado, diluyéndose previamente con dimetilsulfóxido (DMSO) para fomentar la disolución de los fármacos lipófilos. Una vez obtenidas, las condiciones (*Tabla 1*) se incuban a 37°C durante 2h en tubos de ensayo de borosilicato tratado con sigmacote® (para evitar pérdidas por la adsorción en el vidrio). Tras la incubación, las membranas se

recolectan en filtros de microfibras de vidrio (Whatman® GF/C) mediante el empleo de un aparato de filtrado Dottikon CH-5606 (Inotech, Dottikon, Switzerland) que utilizará un tampón de lavado (EDTA 1 mM, MgCl₂ 3 mM, Tris-HCl 50 mM y BSA 0,5%; pH 7.4). Los trozos de filtro se recolectan y se depositan en viales, que son rellenos con el líquido de centelleo Ultima Gold (Perkin Elmer, Boston MA, USA), el cual fomentará la transmisión de las radiaciones β. Mediante el contador de centelleo líquido Packard Tri-Carb 2200CA (PerkinElmer, Boston MA, USA) se obtienen los datos que finalmente expresarán en porcentaje de inhibición de la unión de [³H]CP55940 al receptor.

Ensayo de acople funcional de [³⁵S]GTPγS

En este ensayo se utilizan únicamente las moléculas que hayan obtenido resultados óptimos en los apartados anteriores. Todas las condiciones contienen una concentración de 10⁻⁵ M de CP55940 para realizar el ensayo en las mismas condiciones que los del ensayo anterior, 50 μM de GDP y 0,1 nM de GTPγ³⁵S. Se realizan como mínimo por duplicado, diluyéndose previamente con dimetilsulfóxido (DMSO). Al igual que en el ensayo anterior, se resuspenden las membranas en el tampón de incubación (EDTA 1 mM, MgCl₂ 3 mM, Tris-HCl 50 mM y BSA 1%; pH 7.4) para obtener una concentración final de membrana de 0,1 mg/mL en cada uno de los tubos de ensayo de vidrio de borosilicato tratado con sigmacote®. Por un lado, mediante los preparados sin fármacos se establecen las condiciones basales. Por otro lado, los valores no específicos se obtendrán mediante una condición en la cual se añade un exceso de GTPγS, el cual no es detectable al carecer de radioligando y desplazará al GTPγ³⁵S de todos sus sitios de unión. Se preparan distintas condiciones, cada una con un antagonista selectivo de cada uno de los receptores endocannabinoides CB₁ SR141716A y CB₂ SR14428 a una concentración de 10⁻⁴ M. De este modo, se obtendrá información sobre la especificidad de la molécula sobre cada uno de los receptores. Se disponen condiciones con concentraciones crecientes del fármaco, siendo la concentración de 10⁻¹¹ M la más baja y 10⁻⁴ M la más alta para cada uno de los fármacos a estudiar. Las condiciones (*Tabla 2*) se incuban a 37°C durante 2h y se recolectan en los filtros de microfibras de vidrio Whatman® GF/C mediante el empleo del equipo de filtrado Dottikon CH-5606 (Inotech, Dottikon, Switzerland) que utilizará un tampón de lavado (EDTA 1 mM, MgCl₂ 3 mM, Tris-HCl 50 mM y BSA 0,5%; pH 7.4). Los trozos de filtro se recolectan y se depositan en viales, rellenándolos con el líquido de centelleo Ultima Gold (Perkin Elmer, Boston MA, USA). Mediante el contador de centelleo líquido Packard Tri-Carb 2200CA (PerkinElmer, Boston MA, USA) se obtienen los datos que finalmente se expresan en porcentajes de activación de la unión de GTPγ³⁵S a la proteína G del receptor.

- **Tabla 1:** representación de la disposición de las distintas disoluciones preparadas en el procedimiento del desplazamiento de la unión de [³H]CP55940 en membranas celulares procedentes de corteza cerebral de rata Sprague-Dawley para dos fármacos. La capacidad del equipo de filtrado limita el número de pocillos a 48, por lo que las moléculas se estudiaron en pareja -

Desplazamiento de [³ H]CP55940															
FÁRMACO 1								FÁRMACO 2							
T ₁		-10 ₁		-7 ₁		-4 ₁		T ₁		-10 ₁		-7 ₁		-4 ₁	
Vehículo	50µL	Fármaco	50µL	Fármaco	50µL	Fármaco	50µL	Vehículo	50µL	Fármaco	50µL	Fármaco	50µL	Fármaco	50µL
Tampón	25µL	Tampón	25µL	Tampón	25µL	Tampón	25µL	Tampón	25µL	Tampón	25µL	Tampón	25µL	Tampón	25µL
CP	25µL	CP	25µL	CP	25µL	CP	25µL	CP	25µL	CP	25µL	CP	25µL	CP	25µL
Membrana	400µL	Membrana	400µL	Membrana	400µL	Membrana	400µL	Membrana	400µL	Membrana	400µL	Membrana	400µL	Membrana	400µL
T ₂		-10 ₂		-7 ₂		-4 ₂		T ₂		-10 ₂		-7 ₂		-4 ₂	
Vehículo	50µL	Fármaco	50µL	Fármaco	50µL	Fármaco	50µL	Vehículo	50µL	Fármaco	50µL	Fármaco	50µL	Fármaco	50µL
Tampón	25µL	Tampón	25µL	Tampón	25µL	Tampón	25µL	Tampón	25µL	Tampón	25µL	Tampón	25µL	Tampón	25µL
CP	25µL	CP	25µL	CP	25µL	CP	25µL	CP	25µL	CP	25µL	CP	25µL	CP	25µL
Membrana	400µL	Membrana	400µL	Membrana	400µL	Membrana	400µL	Membrana	400µL	Membrana	400µL	Membrana	400µL	Membrana	400µL
-12 ₁		-9 ₁		-6 ₁				-12 ₁		-9 ₁		-6 ₁		NS	
Fármaco	50µL	Fármaco	50µL	Fármaco	50µL			Fármaco	50µL	Fármaco	50µL	Fármaco	50µL	Antagonista	25µL
Tampón	25µL	Tampón	25µL	Tampón	25µL			Tampón	25µL	Tampón	25µL	Tampón	25µL	Vehículo	50µL
CP	25µL	CP	25µL	CP	25µL			CP	25µL	CP	25µL	CP	25µL	CP	25µL
Membrana	400µL	Membrana	400µL	Membrana	400µL			Membrana	400µL	Membrana	400µL	Membrana	400µL	Membrana	400µL
-12 ₂		-9 ₂		-6 ₂				-12 ₂		-9 ₂		-6 ₂		NS	
Fármaco	50µL	Fármaco	50µL	Fármaco	50µL			Fármaco	50µL	Fármaco	50µL	Fármaco	50µL	Antagonista	25µL
Tampón	25µL	Tampón	25µL	Tampón	25µL			Tampón	25µL	Tampón	25µL	Tampón	25µL	Vehículo	50µL
CP	25µL	CP	25µL	CP	25µL			CP	25µL	CP	25µL	CP	25µL	CP	25µL
Membrana	400µL	Membrana	400µL	Membrana	400µL			Membrana	400µL	Membrana	400µL	Membrana	400µL	Membrana	400µL
-11 ₁		-8 ₁		-5 ₁				-11 ₁		-8 ₁		-5 ₁		NS	
Fármaco	50µL	Fármaco	50µL	Fármaco	50µL			Fármaco	50µL	Fármaco	50µL	Fármaco	50µL	Antagonista	25µL
Tampón	25µL	Tampón	25µL	Tampón	25µL			Tampón	25µL	Tampón	25µL	Tampón	25µL	Vehículo	25µL
CP	25µL	CP	25µL	CP	25µL			CP	25µL	CP	25µL	CP	25µL	CP	25µL
Membrana	400µL	Membrana	400µL	Membrana	400µL			Membrana	400µL	Membrana	400µL	Membrana	400µL	Membrana	400µL
-11 ₂		-8 ₂		-5 ₂				-11 ₂		-8 ₂		-5 ₂		NS	
Fármaco	50µL	Fármaco	50µL	Fármaco	50µL			Fármaco	50µL	Fármaco	50µL	Fármaco	50µL	Antagonista	25µL
Tampón	25µL	Tampón	25µL	Tampón	25µL			Tampón	25µL	Tampón	25µL	Tampón	25µL	Vehículo	50µL
CP	25µL	CP	25µL	CP	25µL			CP	25µL	CP	25µL	CP	25µL	CP	25µL
Membrana	400µL	Membrana	400µL	Membrana	400µL			Membrana	400µL	Membrana	400µL	Membrana	400µL	Membrana	400µL

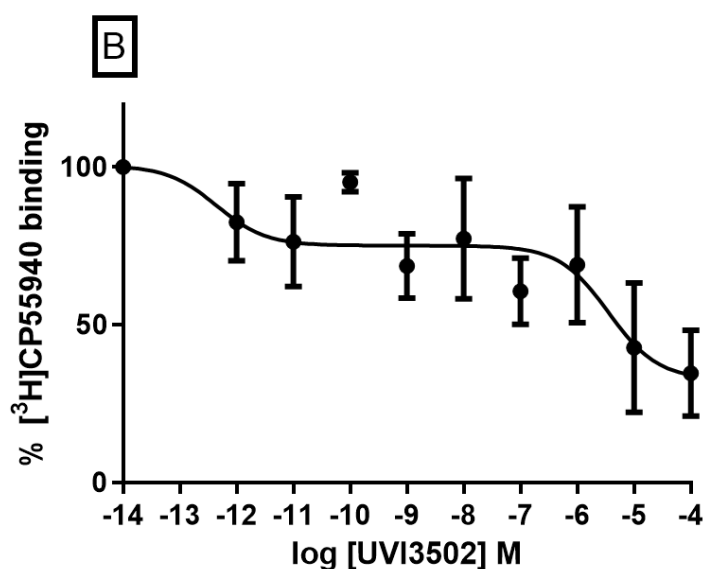
- **Tabla 2:** representación de la disposición de las distintas disoluciones preparadas en el procedimiento del fijación de [³⁵S]GTPγS en membranas celulares procedentes de corteza cerebral de rata Sprague-Dawley para dos fármacos. La capacidad del equipo de filtrado limita el número de pocillos a 48. -

Fijación de [³⁵ S]GTPγS													
BS		-10₁		-8₁		-6₁		-4₁		CP vs UVI₁		ANT CB2₁	
Vehículo	30μL	UVI	30μL	UVI	30μL	UVI	30μL	UVI	30μL	CP	30μL	ANT CB ₂	30μL
Tampón	30μL	Tampón	30μL	Tampón	30μL	Tampón	30μL	Tampón	30μL	UVI	30μL	UVI	30μL
GDP	30μL	GDP	30μL	GDP	30μL	GDP	30μL	GDP	30μL	GDP	30μL	GDP	30μL
Membrana	400μL	Membrana	400μL	Membrana	400μL	Membrana	400μL	Membrana	400μL	Membrana	400μL	Membrana	400μL
GTPγS ³⁵	10μL	GTPγS ³⁵	10μL	GTPγS ³⁵	10μL	GTPγS ³⁵	10μL	GTPγS ³⁵	10μL	GTPγS ³⁵	10μL	GTPγS ³⁵	10μL
BS		-10₂		-8₂		-6₂		-4₂		CP vs UVI₂		ANT CB2₂	
Vehículo	30μL	UVI	30μL	UVI	30μL	UVI	30μL	UVI	30μL	CP	30μL	ANT CB ₂	30μL
Tampón	30μL	Tampón	30μL	Tampón	30μL	Tampón	30μL	Tampón	30μL	UVI	30μL	UVI	30μL
GDP	30μL	GDP	30μL	GDP	30μL	GDP	30μL	GDP	30μL	GDP	30μL	GDP	30μL
Membrana	400μL	Membrana	400μL	Membrana	400μL	Membrana	400μL	Membrana	400μL	Membrana	400μL	Membrana	400μL
GTPγS ³⁵	10μL	GTPγS ³⁵	10μL	GTPγS ³⁵	10μL	GTPγS ³⁵	10μL	GTPγS ³⁵	10μL	GTPγS ³⁵	10μL	GTPγS ³⁵	10μL
BS		-10₃		-8₃		-6₃		-4₃		CP vs UVI₃		ANT CB2₃	
Vehículo	30μL	UVI	30μL	UVI	30μL	UVI	30μL	UVI	30μL	CP	30μL	ANT CB ₂	30μL
Tampón	30μL	Tampón	30μL	Tampón	30μL	Tampón	30μL	Tampón	30μL	UVI	30μL	UVI	30μL
GDP	30μL	GDP	30μL	GDP	30μL	GDP	30μL	GDP	30μL	GDP	30μL	GDP	30μL
Membrana	400μL	Membrana	400μL	Membrana	400μL	Membrana	400μL	Membrana	400μL	Membrana	400μL	Membrana	400μL
GTPγS ³⁵	10μL	GTPγS ³⁵	10μL	GTPγS ³⁵	10μL	GTPγS ³⁵	10μL	GTPγS ³⁵	10μL	GTPγS ³⁵	10μL	GTPγS ³⁵	10μL
-11₁		-9₁		-7₁		-5₁		CP₁		ANT CB1₁		NS	
UVI	30μL	UVI	30μL	UVI	30μL	UVI	30μL	CP	30μL	ANT CB ₁	30μL	Tampón	30μL
Tampón	30μL	Tampón	30μL	Tampón	30μL	Tampón	30μL	Tampón	30μL	UVI	30μL	GTPγS	30μL
GDP	30μL	GDP	30μL	GDP	30μL	GDP	30μL	GDP	30μL	GDP	30μL	GDP	30μL
Membrana	400μL	Membrana	400μL	Membrana	400μL	Membrana	400μL	Membrana	400μL	Membrana	400μL	Membrana	400μL
GTPγS ³⁵	10μL	GTPγS ³⁵	10μL	GTPγS ³⁵	10μL	GTPγS ³⁵	10μL	GTPγS ³⁵	10μL	GTPγS ³⁵	10μL	GTPγS ³⁵	10μL
-11₂		-9₂		-7₂		-5₂		CP₂		ANT CB1₂		NS	
UVI	30μL	UVI	30μL	UVI	30μL	UVI	30μL	CP	30μL	ANT CB ₁	30μL	Tampón	30μL
Tampón	30μL	Tampón	30μL	Tampón	30μL	Tampón	30μL	Tampón	30μL	UVI	30μL	GTPγS	30μL
GDP	30μL	GDP	30μL	GDP	30μL	GDP	30μL	GDP	30μL	GDP	30μL	GDP	30μL
Membrana	400μL	Membrana	400μL	Membrana	400μL	Membrana	400μL	Membrana	400μL	Membrana	400μL	Membrana	400μL
GTPγS ³⁵	10μL	GTPγS ³⁵	10μL	GTPγS ³⁵	10μL	GTPγS ³⁵	10μL	GTPγS ³⁵	10μL	GTPγS ³⁵	10μL	GTPγS ³⁵	10μL
-11₃		-9₃		-7₃		-5₃		CP₃		ANT CB1₃		NS	
UVI	30μL	UVI	30μL	UVI	30μL	UVI	30μL	CP	30μL	ANT CB ₁	30μL	Tampón	30μL
Tampón	30μL	Tampón	30μL	Tampón	30μL	Tampón	30μL	Tampón	30μL	UVI	30μL	GTPγS	30μL
GDP	30μL	GDP	30μL	GDP	30μL	GDP	30μL	GDP	30μL	GDP	30μL	GDP	30μL
Membrana	400μL	Membrana	400μL	Membrana	400μL	Membrana	400μL	Membrana	400μL	Membrana	400μL	Membrana	400μL
GTPγS ³⁵	10μL	GTPγS ³⁵	10μL	GTPγS ³⁵	10μL	GTPγS ³⁵	10μL	GTPγS ³⁵	10μL	GTPγS ³⁵	10μL	GTPγS ³⁵	10μL

Resultados y Discusión

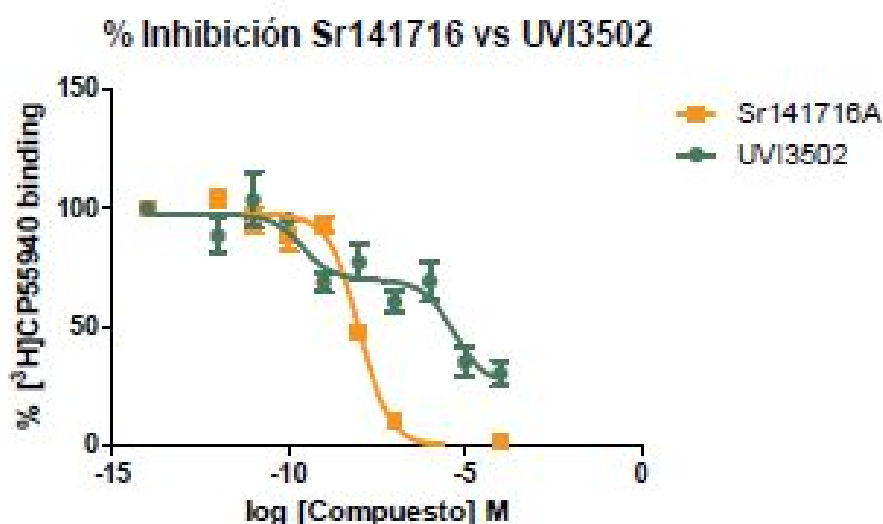
Desplazamiento de la unión de [³H]CP55940 con nuevas moléculas de síntesis en membranas de corteza cerebral de rata.

Los resultados obtenidos en el ensayo de desplazamiento del ligando CP55940 (*Figura 4*), determinan que los compuestos UVI3501 (A), UVI3503 (C), UVI3504 (D), UVI3505 (E), UVI3506 (F), UVI3507 (G), UVI3508 (H), UVI3509 (I), UVI3511 (K) y UVI8113 (L) carecen de la capacidad de desplazar el [³H]CP55940 y, por tanto, no se unen a los lugares de unión del radioligando. En cambio, UVI3502 (B) y UVI3510 (J) consiguen desplazar aparentemente al [³H]CP55940, lo cual indicaría que sí tienen la capacidad de unirse a los sitios de unión del CP55940. Por un lado, UVI3510 mostró una IC₅₀=1,147e-006, un porcentaje máximo de acoplamiento de [³H]CP55940 del 112.5% y una R²=0.8927. Por otro lado, UVI3502 obtuvo una IC₅₀=7,116e-008, un porcentaje máximo de acoplamiento de [³H]CP55940 del 100.9% y una R²=0,5800. El experimento del desplazamiento del [³H]CP55940 se repitió con estas dos moléculas, de las cuales UVI3510 (J) fue descartada al no demostrar unión con el receptor, mientras que UVI3502 (B) logró unos resultados positivos, siendo el ajuste del modelo gráfico a dos sitios de unión con una n=6 (*Figura 2*).



- **Figura 2.** Gráfica del desplazamiento de la unión del radioligando [³H]CP55940 al receptor endocannabinoide CB₁ de membranas de corteza cerebral de rata Sprague-Dawley a distintas concentraciones de UVI3502. n=6-

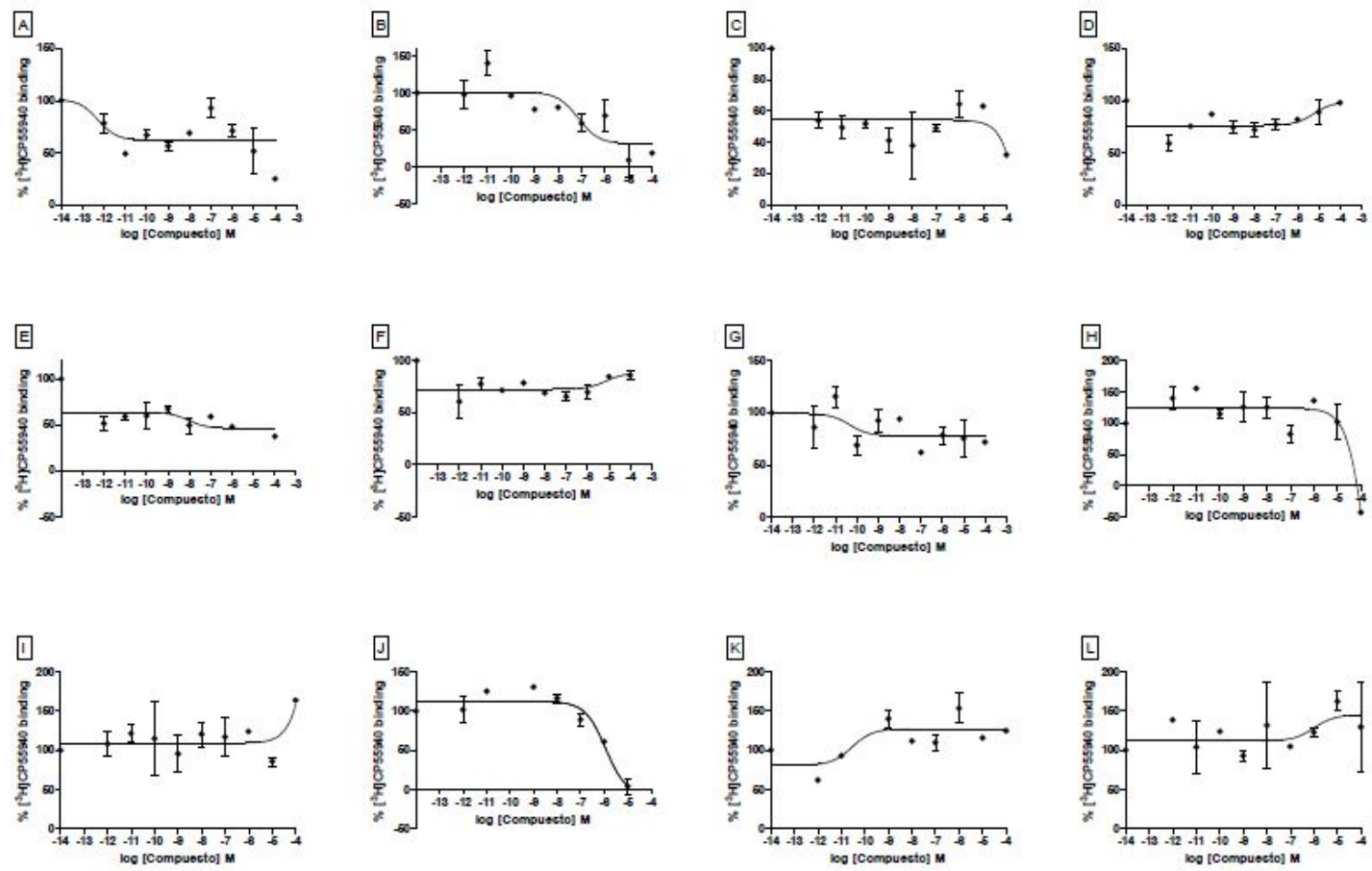
Los resultados del ensayo con el compuesto UVI3502 (*Figura 2*) revelaron una $IC_{50Hi}=4,441e-013$ y una $IC_{50Lo}=3,578e-006$ correspondientes al lugar de unión de alta y una baja afinidad respectivamente. El porcentaje máximo de acoplamiento de $[^3H]CP55940$ fue del 90,23% y una $R^2=0,7248$. Por tanto, se concluye que el compuesto B tiene afinidad frente a dos sitios de unión comunes a los sitios de unión de la molécula CP55940. No obstante, se desconoce a qué receptores o estados conformacionales hacen referencia los lugares de unión, únicamente se describe su existencia. Además, la unión al receptor no implica su activación; es por ello que aún no se puede concluir qué tipo de interacción mantiene con el receptor o receptores, si se trata de un antagonista o de algún tipo de agonismo, ya sea parcial, total o inverso. El resultado de la molécula de UVI3502 se ha comparado con los datos obtenidos en experimentos anteriores del desplazamiento de CP55940 mediante el antagonista específico CB₁ SR141716A (*Figura 3*). El ajuste del modelo gráfico del antagonista es de 1 único sitio de unión, n=3.



- **Figura 3.** Gráficas del desplazamiento de la unión del radioligando $[^3H]CP55940$ al receptor endocannabinoide CB₁ de membranas de corteza cerebral de rata Sprague-Dawley a distintas concentraciones de UVI3502 (verde) y de SR141716A (naranja). Datos expresados como porcentaje de inhibición-

A diferencia del antagonista específico SR141716A, la molécula UVI3502 no consigue desplazar por completo al radioligando $[^3H]CP55940$. Este tiene afinidad frente a los receptores endocannabinoides CB₁, CB₂ y el receptor acoplado a proteína G 55 (GPR55). Los dos sitios de unión observados con la molécula UVI3502 podrían ser cualquiera de los tres receptores con los que guarda afinidad CP55940, sin descartar la posibilidad de que

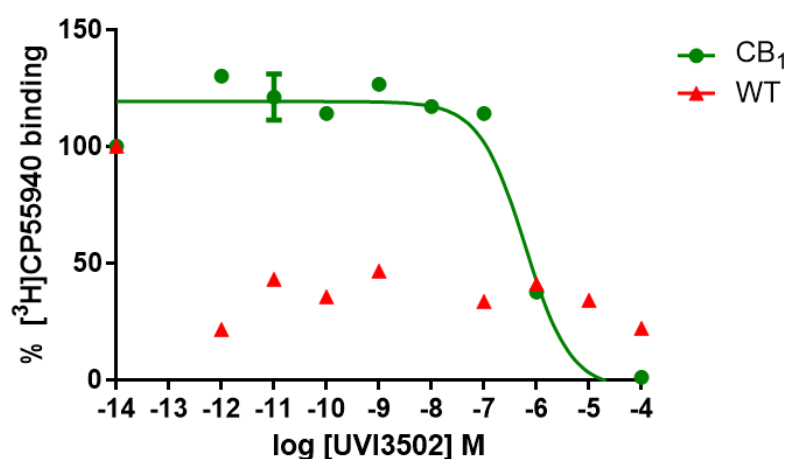
ambos lugares de unión pertenezcan a un solo receptor. A diferencia de los receptores CB₁ y GPR55, el receptor CB₂ no está extensamente presente en el SNC¹⁶ y SR141716A no tiene afinidad descrita frente a este receptor^{17,18,19}, por lo que no podría haber podido desplazar por completo al radioligando [³H]CP55940. Por lo tanto, la posibilidad de que uno de los lugares de acción se trate del receptor CB₂ es escasa. Con el fin de verificar la afinidad hacia CB₁ e intentar averiguar a qué lugar de unión, si el de baja o alta afinidad corresponde al receptor CB₁, debe realizarse otro procedimiento que descarte cualquier receptor que no sea CB₁ y, por tanto, aislar la unión del radioligando con el receptor. En este trabajo, se realiza un procedimiento de unión de radioligandos con membranas de células que sobreexpresan el receptor cannabinoide CB₁. Mediante esta técnica solo se observa unión con el receptor CB₁, pudiendo aclarar la relación de la molécula UVI3502 con receptor endocannabinoide (*Figura 5*).



- **Figura 4.** Gráficas del desplazamiento de la unión del radioligando $[^3\text{H}]\text{CP55940}$ al receptor endocannabinoide CB_1 de membranas de corteza de rata Sprague-Dawley a distintas concentraciones de cada una de las doce moléculas de estudio. Ajuste a un sitio de unión. $n=2$. Cada letra corresponde con una molécula de estudio: UVI3501 (A), UVI3502 (B), UVI3503 (C), UVI3504 (D), UVI3505 (E), UVI3506 (F), UVI3507 (G), UVI3508 (H), UVI3509 (I), UVI3510 (J), UVI3511 (K) y UVI8113 (L)

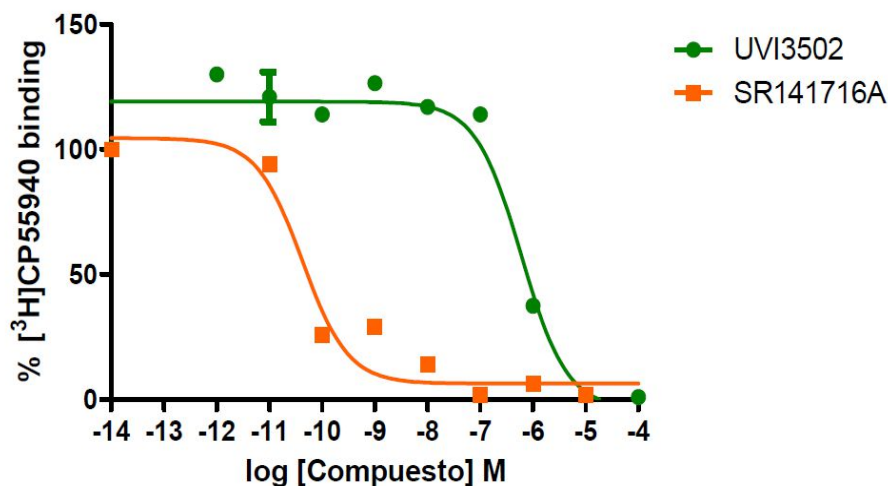
Desplazamiento de la unión de [³H]CP55940 con UVI3502 en membranas de células que sobreexpresan receptores CB₁.

En los experimentos realizados en membranas de células que sobreexpresan receptores CB₁ se observó un desplazamiento de [³H]CP55940 que se ajustaba a un modelo gráfico de un único sitio de unión (*Figura 5*). Su IC₅₀ fue de 6,050e-007, con un porcentaje máximo de acoplamiento de [³H]CP55940 de 119,1% y una R² de 0,9664. Por otro lado, en las membranas de células *wildtype* no se observó desplazamiento de [³H]CP55940 por parte del compuesto B (*figura 5*). Ambas gráficas se desarrollaron con una n=2 (puntos por duplicado).



- **Figura 5.** Gráfica del desplazamiento de la unión del radioligando [³H]CP55940 al receptor endocannabinoide CB₁ de membranas de células que sobreexpresan receptores CB₁ (verde) y en membranas de células control wildtype (rojo) a distintas concentraciones de UVI3502. -

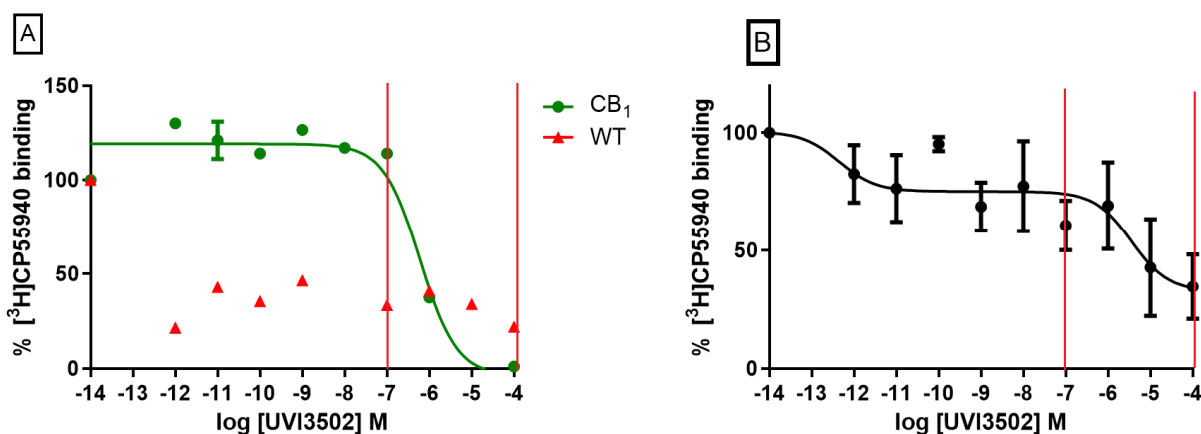
El resultado del desplazamiento de [³H]CP55940 mediante UVI3502 fue comparado con el resultado de un experimento previo que utilizaba el antagonista específico CB₁ SR141716A para el desplazamiento del radioligando [³H]CP55940 en membranas de células que sobreexpresan receptores CB₁ (*Figura 6*). La comparación tiene como objetivo observar si la afinidad y el acoplamiento máximo de la molécula UVI3502 por los receptores endocannabinoide CB₁ son equiparables al de un antagonista específico del receptor endocannabinoide CB₁.



- **Figura 6.** Gráficas del desplazamiento de la unión del radioligando [³H]CP55940 al receptor endocannabinoide CB₁ de membranas de células que sobreexpresan receptores CB₁ a distintas concentraciones de UVI3502 (verde) y de SR141716A (naranja).-

UVI3502 es capaz de producir un desplazamiento del [³H]CP55940 con una IC₅₀ de 6,05e-007 M en células que sobreexpresan receptores endocannabinoides CB₁. En cambio, en células wildtype, este desplazamiento no ocurre, indicando así la especificidad de la molécula hacia el receptor CB₁. En membranas de células que sobreexpresan receptores endocannabinoides CB₁, la afinidad de UVI3502 por el receptor endocannabinoide CB₁ es menor que la del antagonista específico SR141716A, pero tiene un acoplamiento máximo similar (*Figura 6*).

Si se comparan las gráficas de desplazamiento del anterior experimento frente al desplazamiento en células que sobreexpresan CB₁, existe una correlación entre ambas gráficas (*Figura 7*). En el desplazamiento en membranas, UVI3502 se ajustó a un modelo gráfico de dos sitios de unión, uno de los cuales se relaciona en concentración con el desplazamiento en membranas de células que sobreexpresan CB₁, el sitio de unión de baja afinidad; con una IC_{50Lo}= 3,578e-006 M en membranas celulares de corteza cerebral de rata y una IC₅₀= 6,05e-007 M en membranas celulares de células que sobreexpresan receptores CB₁.

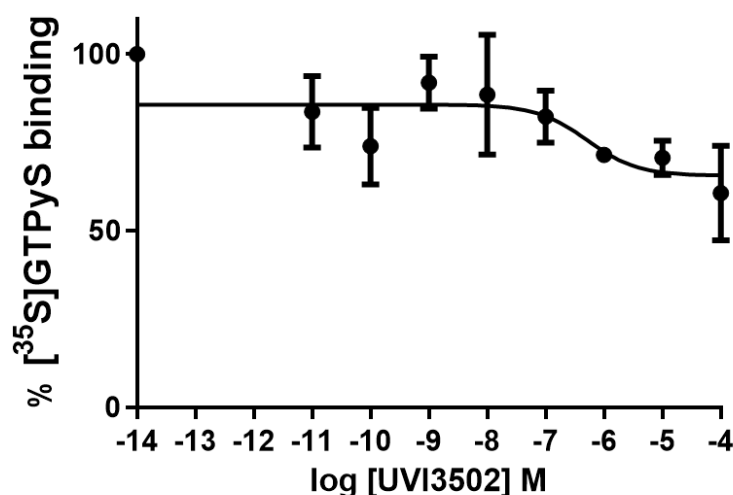


- **Figura 7.** Comparación de las gráficas del desplazamiento de la unión del radioligando $[^3\text{H}]\text{CP55940}$ al receptor endocannabinoide CB₁ de membranas de células que sobreexpresan receptores CB₁ (A) y de membranas de corteza de rata Sprague-Dawley (B) a distintas concentraciones de UVI3502 -

Sin embargo, aún no hay certeza de que el sitio de baja afinidad sea CB₁ y cabe destacar que ambos ensayos no alcanzan el mismo acoplamiento máximo, por lo que esta idea debe ser corroborada con futuros experimentos concluyentes. Se desconoce a qué receptor hace referencia el sitio de unión de alta afinidad, al cual se consiguen unir tanto el $[^3\text{H}]\text{CP55940}$ como el UVI3502. Este receptor podría tratarse del GPR55²⁰, un receptor posiblemente endocannabinoide ampliamente distribuido por el SNC¹², debido a la conocida capacidad unión del $[^3\text{H}]\text{CP55940}$ a este receptor^{12,21}. Además, el SR171416A también tiene afinidad por este receptor^{17,18}, por lo que $[^3\text{H}]\text{CP55940}$ se hubiera desplazado de los receptores GPR55 en las condiciones no específicas. Respecto a esto, la implicación del receptor GPR55 podría suponer un nuevo abanico de efectos sumatorios a los del receptor CB₁ para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, dado que se ha observado un efecto neuroprotector en las células del SNC debido a la modulación de la respuesta neuroinflamatoria producida por la interacción con el receptor GPR55^{22,23}. Para poder demostrar la implicación del receptor GPR55 podrían realizarse experimentos de fijación de radioligandos específicos para este receptor, utilizando una molécula de conocida afinidad por el receptor para desplazar al radioligando, como el LPI²⁴. Dicho experimento podría realizarse tanto en membranas de corteza cerebral como en células que sobreexpresan el receptor GPR55 empleando un antagonista específico para establecer las condiciones no específicas, como por ejemplo el ML193^{25,26}. Se puede decir, por tanto, que el UVI3502 es específico de dos sitios de unión de la molécula CP55940, uno de los cuales se trata del receptor endocannabinoide CB₁ mientras que el segundo aún queda indefinido. El segundo receptor puede ser cualquiera de ambos receptores CB₂, GPR55 o, incluso, un segundo lugar de unión del propio receptor CB₁ o una de sus isoformas²⁷.

Ensayo de acople funcional de [³⁵S]GTPγS

La molécula UVI3502 reduce su unión específica de [³⁵S]GTPγS en un 20% frente al total establecido por la actividad basal de los receptores de las membranas (*Figura 8*). El *binding* de [³⁵S]GTPγS se ajustó a un modelo gráfico de 1 sitio de unión, con una IC₅₀ de 5.136e-007 y una R² de 0,2334.



- **Figura 8.** Gráfica binding de [³⁵S]GTPγS en membranas de corteza de rata Sprague-Dawley a distintas concentraciones de UVI3502. (n=3) -

Una menor unión de [³⁵S]GTPγS a las proteínas G_{i/o} acopladas a los receptores endocannabinoides indica que el cambio conformacional en los receptores se está reduciendo y, por tanto, el efecto a partir de unas concentraciones de entre 10⁻⁷ y 10⁻⁴ M. Al reducirse la actividad basal UVI3502 podría tratarse de un agonista inverso, cuyo efecto consistiría en reducir la actividad constitutiva de los receptores, alterando el estado del receptor de un estado activo a uno inactivado. Este cambio de estado activado a inactivado impide que el receptor se active de forma espontánea, actividad constitutiva, reduciendo los niveles basales que obtenemos por la acción de UVI3502. Los resultados no permiten discernir si la acción agonista inversa pertenece a su interacción con el receptor endocannabinoide CB₁ o si se trata de una interacción con otro receptor, como el propuesto GPR55 o de ambos receptores simultáneamente, etc. Por tanto, UVI3502 no produce una activación y señalización del receptor CB₁ generando un efecto antagónico sobre el receptor. Este efecto antagónico podría tener diversas utilidades en terapéutica. Por ejemplo, actualmente, se investiga el uso del rimonabant (SR141716A) para el tratamiento de la obesidad y desequilibrios alimentarios^{27,28}.

Se debe tener en cuenta que el experimento de fijación GTPγS ha sido realizado únicamente en corteza cerebral. En esta región del cerebro, los receptores endocannabinoides se encuentran presentes en toda la corteza⁹; aun así, la concentración de receptores es inferior a otras áreas del cerebro⁹. Podría suponer la observación de un efecto distinto en distintas áreas del cerebro según la distribución del sistema endocannabinoide y el perfil lipídico¹¹. Con el fin de obtener la certeza del tipo de efecto que tiene la molécula UVI3502 se podría realizar un experimento de unión específica de [³⁵S]GTPγS en secciones de tejido, es decir, poder observar su efecto en cada una de las regiones del cerebro y hacer una comparación de estas con resolución anatómica.

En cualquier caso, se debería buscar un efecto agonista de los receptores endocannabinoides CB₁ ya que el agonismo de los receptores es de interés para la búsqueda de un nuevo tratamiento efectivo para las enfermedades neurodegenerativas como la EA, enfermedad de Huntington o Parkinson⁷. De hecho, el agonismo de estos receptores puede tener varias aplicabilidades en la terapéutica como la regularización de la arquitectura del sueño o en la epilepsia^{29,30}. La molécula UVI3502 puede utilizarse para basarse en el diseño de otra serie de nuevas moléculas de síntesis con el objetivo de hallar un efecto agonista frente al receptor CB₁, pues tiene una afinidad demostrada hacia el receptor endocannabinoide CB₁.

En resumen, la molécula UVI3502 se une a dos sitios de unión de la molécula CP55940, de los cuales, como mínimo, uno pertenece al receptor endocannabinoide CB₁ y su efecto a nivel de la corteza cerebral en los receptores acoplados es de un agonismo inverso o de antagonista. Son necesarias futuras investigaciones para clarificar su el tipo de interacción con los receptores endocannabinoides y la hipótesis de la unión al GPR55; además de experimentos *in vivo* para observar su efecto a nivel global en el SNC, en el comportamiento del animal y en el desarrollo de la EA.

Conclusiones

La realización de este cribado ha podido determinar la actividad de 12 moléculas de nueva síntesis con potencial para diseñar un tratamiento efectivo para la enfermedad del Alzheimer. Se ha determinado que la molécula UVI3502 es capaz de unirse al receptor endocannabinoide CB₁ además de a otro sitio de unión de la molécula CP55940. Su efecto en los receptores de corteza cerebral de rata es de un agonista inverso, aunque se desconoce si este efecto se comparte en el resto de áreas cerebrales. Este proyecto será la base para futuras investigaciones con la propia molécula UVI3502 en otras áreas cerebrales y para la investigación con moléculas análogas para la creación de un nuevo tratamiento efectivo contra la enfermedad del Alzheimer.

- La molécula UVI3502 es la única molécula de las 12 estudiadas que ha conseguido desplazar con éxito al radioligando [³H]CP55940 y, por tanto, presenta afinidad frente al receptor CB₁. El desplazamiento se ha ajustado a un modelo gráfico de dos sitios de unión, lo cual indica que tiene la capacidad de unirse a dos receptores distintos. Se ha demostrado que el sitio de unión de baja afinidad se relaciona con el receptor endocannabinoide CB₁.
- La molécula UVI3502 reduce en un 20% la actividad constitutiva de los receptores endocannabinoides CB₁ en membranas celulares de corteza cerebral de rata. Por lo tanto, se concluye que UVI3502 posee un efecto agonista inverso frente a los receptores CB₁ en esta área cerebral.
- Los resultados abren un nuevo abanico de futuros experimentos tanto con la molécula UVI3502 como moléculas análogas a esta. El efecto agonista inverso podría tener utilidades tanto frente a la enfermedad del Alzheimer como para otras patologías, por lo que esta investigación será el punto de partida de futuros experimentos para poder mejorar el bienestar y la salud de la población en los próximos años.

Bibliografía

1. Weller J, Budson A. Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment [Internet]. 2021. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6073093/>
2. Pérez A. El 35% de los casos de Alzheimer se pueden atribuir a nueve factores de riesgo modificables [Internet]. Eleconomico.es. 2021. Disponible en:
<https://www.sen.es/saladeprensa/pdf/Link280.pdf>
3. Bondi M, Edmonds E, Salmon D. Alzheimer's Disease: Past, Present, and Future [Internet]. 2021. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5830188/>
4. González H, Visentin S. Nutrientes y neurodesarrollo: lípidos: actualización [Internet]. Digital.cic.gba.gob.ar. 2021. Disponible en:
https://www.sap.org.ar/docs/publicaciones/primer/2016/Act_Gonzalez_anticipo_12-9-16.pdf
5. Dimas P, Montani L, A Pereira J, Moreno D, Trötz Müller M, Gerber J, et al. CNS myelination and remyelination depend on fatty acid synthesis by oligodendrocytes [Internet]. eLife. 2021. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6504237/>
6. Aguirre-Rueda D, Guerra-Ojeda S, Aldasoro M, Iradi A, Obrador E, D. Mauricio M, et al. WIN 55,212-2, Agonist of Cannabinoid Receptors, Prevents Amyloid β_{1-42} Effects on Astrocytes in Primary Culture. PLoS One [Internet]. 2015. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4395436/>
7. Basavarajappa B, Shivakumar M, Joshi V, Subbanna S. Endocannabinoid system in neurodegenerative disorders [Internet]. 2021. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5669051/>
8. Russo E. Cannabis Therapeutics and the Future of Neurology. Frontiers in Integrative Neuroscience [Internet]. 2021. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6200872/>

9. Mackie K. Distribution of Cannabinoid Receptors in the Central and Peripheral Nervous System [Internet]. 2021. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16596779/>
10. Pacher P, Bátkai S, Kunos G. The Endocannabinoid System as an Emerging Target of Pharmacotherapy [Internet]. 2008. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2241751/>
11. Zou S, Kumar U. Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System [Internet]. Int J Mol Sci. 2018. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5877694/>
12. Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson N-O, Leonova J, et al. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor [Internet]. Br J Pharmacol. 2007. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2095107/>
13. WIN55212-2 | Ligand page | IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY [Internet]. Guidetopharmacology.org. 2021. Disponible en: <https://www.guidetopharmacology.org/GRAC/LigandDisplayForward?tab=refs&ligandId=733>
14. Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie K, Blond O, et al. Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors [Internet]. PubMed. 2021. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7565624/>
15. Greish K, Mathur A, Al Zahrani R, Elkaissi S, Al Jishi M, Nazzal O, et al. Synthetic cannabinoids nano-micelles for the management of triple negative breast cancer [Internet]. PubMed. 2018. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30367922/>
16. Murphy T, Le Foll B. Targeting the Endocannabinoid CB1 Receptor to Treat Body Weight Disorders: A Preclinical and Clinical Review of the Therapeutic Potential of Past and Present CB1 Drugs [Internet]. 2020. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7356944/#B8-biomolecules-10-00855>

17. Bergman J, S. Delatte M, A. Paronis C, Vemuri K, Pandarinathan P, A. Thakur G, et al. Some Effects of CB1 Antagonists with Inverse Agonist and Neutral Biochemical Properties [Internet]. *Physiol Behav.* 2009. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2441972/>
18. Rimonabant | Ligand page | IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY [Internet]. *Guidetopharmacology.org.* 2021. Disponible en: <https://www.guidetopharmacology.org/GRAC/LigandDisplayForward?tab=biology&ligandId=743>
19. Rinaldi-Carmona M, Barth F, Héaulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, et al. SR1417 16A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor [Internet]. 1994. Disponible en: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1016/0014-5793%2894%2900773-X>
20. GPR55 | Target page | IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY [Internet]. *Guidetopharmacology.org.* 2021. Disponible en: <https://www.guidetopharmacology.org/GRAC/ObjectDisplayForward?objectId=109>
21. CP55940 | Ligand page | IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY [Internet]. *Guidetopharmacology.org.* 2021. Disponible en: <https://www.guidetopharmacology.org/GRAC/LigandDisplayForward?tab=biology&ligandId=730>
22. D. Hill J, Zuluaga-Ramirez V, Gajghate S, Winfield M, Sriram U, Persidsky Y. Activation of GPR55 induces neuroprotection of hippocampal neurogenesis and immune responses of neural stem cells following chronic, systemic inflammation [Internet]. *Brain Behav Immun.* 2020. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6398994/>
23. Wilke Saliba S, Jauch H, Gargouri B, Keil A, Hurre T, Volz N, et al. Anti-neuroinflammatory effects of GPR55 antagonists in LPS-activated primary microglial cells [Internet]. *Journal of Neuroinflammation.* 2018. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6240959/>

24. LPI | Ligand page | IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY [Internet]. Guidetopharmacology.org. 2021. Disponible en: <https://www.guidetopharmacology.org/GRAC/LigandDisplayForward?tab=biology&ligandId=4028>
25. ML193 | Ligand page | IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY [Internet]. Guidetopharmacology.org. 2021. Disponible en: <https://www.guidetopharmacology.org/GRAC/LigandDisplayForward?tab=biology&ligandId=9967>
26. Heynen-Genel S, Dahl R, Shi S, Milan L, Hariharan S, Sergienko E, et al. Screening for Selective Ligands for GPR55 – Antagonists [Internet]. 2010. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK66153/>
27. González-Mariscal I, M. Krzysik-Walker S, E. Doyle M, Liu Q, Cimbro R, Santa-Cruz Calvo S, et al. Human CB1 Receptor Isoforms, present in Hepatocytes and β -cells, are Involved in Regulating Metabolism. Scientific Reports [Internet]. 2016. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5027555/>
28. Murphy T, Le Foll B. Targeting the Endocannabinoid CB1 Receptor to Treat Body Weight Disorders: A Preclinical and Clinical Review of the Therapeutic Potential of Past and Present CB1 Drugs [Internet]. Biomolecules. 2020. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7356944/#B8-biomolecules-10-00855>
29. W Calik M, W Carley D. Effects of Cannabinoid Agonists and Antagonists on Sleep and Breathing in Sprague-Dawley Rats [Internet]. Sleep. 2017. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5806547/>
30. C. Rosenberg E, H. Patra P, J. Whalley B. Therapeutic effects of cannabinoids in animal models of seizures, epilepsy, epileptogenesis, and epilepsy-related neuroprotection [Internet]. Epilepsy Behav. 2017. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5651410/>