



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD

AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

LICENCIATURA EN QUÍMICA

LABORATORIO DE NEUROFARMACOLOGÍA

**Estudio *in silico* de la interacción del Cannabidiol
(-)-CBD) y sus análogos con el receptor
nicotínico-acetilcolina $\alpha 7$.**

Tesis presentada para obtener el grado de: Licenciado Químico

PRESENTA:

LEONARDO BRAYAN ACEVEDO MEZA

DIRECTOR TESIS:

Dr. Ilhuicamina Daniel Limón Pérez de León

Laboratorio de Neurofarmacología-FCQ, BUAP

CODIRECTOR DE TESIS:

Dr. Alan Carrasco Carballo

Laboratorio de Elucidación y Síntesis en Química Orgánica

LESQO- ICUAP, BUAP

MAYO 2024

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Elucidación y Síntesis en Química Orgánica del Instituto de Ciencias en el área de estudios bioinformáticos en conjunto con el laboratorio de neurofarmacología, bajo la dirección del Dr. Ilhuicamina Daniel Limón Pérez de León y el Dr. Alan Carrasco Carballo.



OFICIO C.Q./CT 023A/2024

Dr. Jorge R. Cerna Cortez
Director Facultad de Ciencias Químicas
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Los que suscriben, integrantes de la Comisión Revisora de Tesis del alumno de la Licenciatura en Química

Leonardo Brayan Acevedo Meza

comunican a Usted la autorización para la publicación del trabajo de tesis bajo la dirección del Dr. Ilhuicamina Daniel Limón Pérez de León y del Dr. Alan Carrasco Carballo, con el siguiente título:

“Estudio in silico de la interacción del Cannabidiol ((-)- CBD) y sus análogos con el receptor nicotínico-acetilcolina $\alpha 7$ ”

Se extiende la presente, para los usos que al interesado convengan el día 16 de mayo de 2024.

Atentamente
“Pensar bien, para vivir mejor”
H. Puebla de Z., a 16 de mayo de 2024

Dr. Jesús Sandoval Ramírez, Presidente

Dra. Laura Morales Lara, Secretario

Dr. Felipe Patricio Martínez, Vocal

c.c.p. Archivo

Cadena digital: 2Vs'Hp*Ut'Wj%Do+No"Ka&CjEw'Yk&Qk/Ee"Wz#He)Ur%MkNm,Zs.Vr+Bc)Sh.Vk\$Sz(Ni
Eh"Hn'Lj&Mj/Bv/Al!Cw%Zl"Rc,Kp)Zq)Qáj,Dr-Dk+Nt,Nn"Rv/Rb+Xl)Np"Kj"Gf'Yp!Pq
Ru+Lz,Qc"Br{Vh%Az+Ch"Wd+Yk"Xn"Rh*Kd'Ks/Xz+Ph!HdN"Uu-Xn+Az/Fy"Gc%De
He/Ng'Wn%Qy.Jb/Wc{NI%Xi\$Rb{Pi%Kx%Yg+Xl.Bc'Kh'Eh/Nj%Dl"Wn!

Facultad
de Ciencias
Químicas

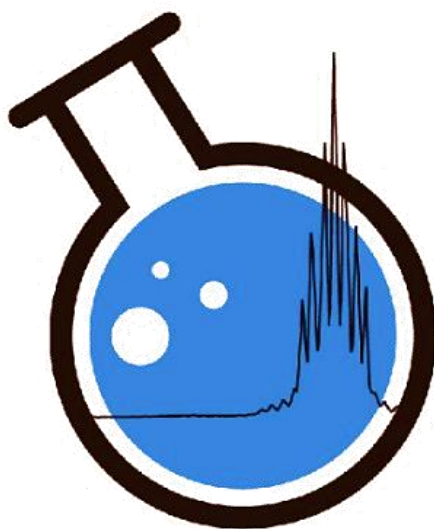
San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 5500 Ext. 7390



BUAP

29 años

ANIVERSARIO



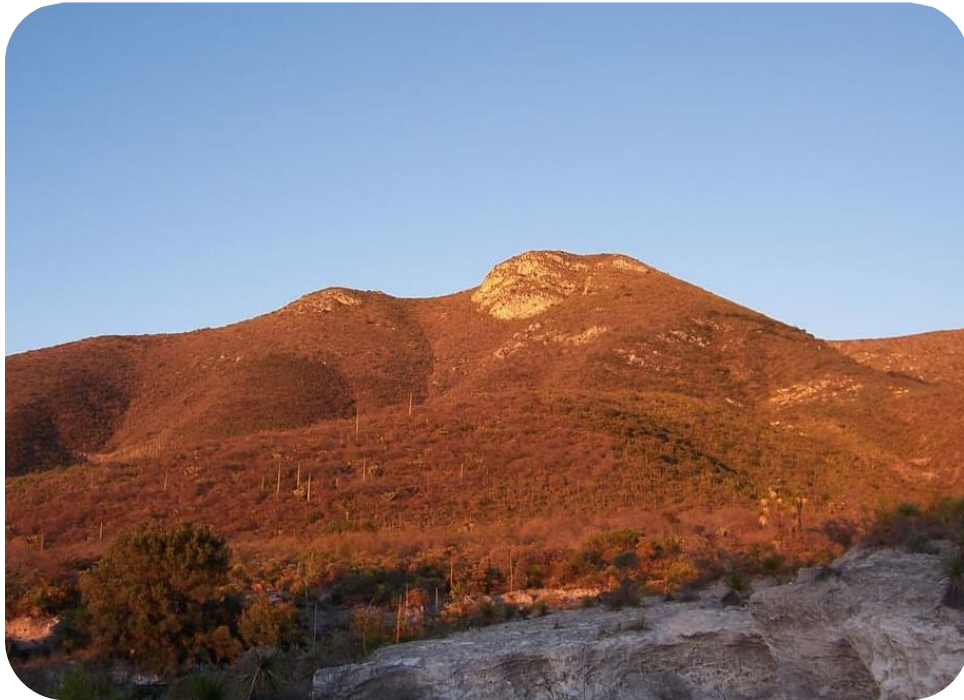
LESQO

Laboratorio de Elucidación y Síntesis
en Química Orgánica

El cerro del Tentzo

La sierra del Tentzo, es una cordillera que se levanta en la altiplanicie poblana, tiene una altitud de 2658m y cruza parte de los municipios de Huehuetlán, Tecali, Tzicatlacoyan, Huatlatlahua, Molcaxac y Tepexi.

Esta zona recibe su nombre debido a que el cerro donde comienza esta cordillera tiene la forma del rostro de un hombre barbudo. El nombre proviene del náhuatl “Tentzo” o “Tentli” que significa borde o labio y “Tzontli” que quiere decir pelo o barba.



La mitología poblana de la región cerca a la cordillera retrata al Tentzo como un “hombre muy mujeriego con mucho dinero” y a la China poblana como una fémica “hermosa como Iztatzihuatl” que el Tentzo quería conquistar. El Tentzo para seducirla, le dio a escoger entre dos baúles. Uno tenía palma, y el otro “carros y riquezas”. La China poblana escogió el baúl de las riquezas, dándole a Puebla capital la prosperidad de ahora, y que aquel baúl que tomó el Tentzo estaba lleno de pura palma”, siendo la causa de que en dicha región se mantengan de palma, porque “El Tentzo le regaló toda su riqueza a la China poblana”.

Gabriela Samia Badillo Gámez

Dedico este trabajo a todas las personas que han sido parte fundamental de mi trayecto académico y personal. A mis padres, por su amor incondicional y apoyo constante. A mi familia, por su comprensión y ánimo en cada etapa de este camino llamado vida. A mis amigos, por compartir conmigo momentos inolvidables y por ser fuente de inspiración. A mis profesores y mentores, por su guía y conocimientos compartidos. A todos ellos, mi más sincero agradecimiento por ser parte de este gran logro.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer sinceramente a mis mentores. Al Dr. Daniel Limón, por su orientación experta, su confianza, paciencia, rigor y apoyo a lo largo de este proyecto. También agradezco al Dr. Alan Carrasco, por la confianza que me otorgó y el espacio que me brindó en el Laboratorio de Elucidación y Síntesis de Química Orgánica, que condujo a contribuciones sustanciales de mi formación profesional. La sabiduría y dedicación de mis directores fue fundamental para completar esta investigación. Muchas gracias.

Agradezco a mis padres, Emilio Acevedo Domínguez y María de los Ángeles Meza Sánchez, por el amor incondicional, comprensión y por ser parte fundamental de mi apoyo emocional, que si bien, durante toda mi carrera universitaria y en mi vida fue lo mejor que me pudieron dar. Su sacrificio y aliento han sido mi mayor motivación. También agradezco a mis amigos Fernanda, Adrián, Victoria, Sergio, Karen y Estefanía por su ánimo y alegría a lo largo de la carrera, gracias por ayudarme a que esta etapa de mi vida fuera más llevadera.

Agradezco a todos los integrantes del Laboratorio de Neurofarmacología (Alondra Rueda, Elizabeth Martínez, Mariana Valencia, Enoc Martínez, Edgar Macuil, Nadezhda Tamara, Steven Flores, Angélica Aguilar, Fernanda López, Carolina de los Santos, Isaac Rafael, Dulce Manuel, Nancy Chávez y Dra. Aleidy Martínez) por su amistad, observaciones y comentarios en cada uno de los seminarios. Agradezco el conocimiento otorgado por cada uno de ustedes, destacando la esencia académica del grupo de trabajo.

A María Isabel Rodríguez del Río, por su amor, paciencia y constante apoyo a lo largo de este proceso. Gracias por ser mi impulso y por creer en mí. Este logro es para los dos.

ABREVIATURAS

SNC: Sistema Nerviosos Central

SNP: Sistema Nervioso Periférico

DA: Dopamina

D1 y D2: Receptor dopaminérgico 1 y Receptor dopaminérgico 2

PPARY: Receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma

TRPV1: Receptor de potencial transitorio V1

G-PR55: Receptor 55 acoplado a proteína G

5-HT1A: Receptor de serotonina 1A

A2A: Receptor de adenosina A_{2A}

nAChR: Receptor Nicotínico de Acetilcolina

nAChR $\alpha 7$: Receptor Nicotínico de Acetilcolina $\alpha 7$

ACh: Acetilcolina

(-)-CBD: Cannabidiol

ECD: Dominio Extracelular

ICD: Dominio Intracelular

TMD: Dominio Transmembranal

RA: Región de Acoplamiento

AEA: Anandamida

2-AG: 2-Araquidonilglicerol

CP55940: 2-[(1R,2R,5R)-5-Hidroxi-2-(3-hidroxiopropil)ciclohexil]-5-(2-metiloctan-2-il) fenol

A β : Amiloide Beta

p-tau: Proteína Tau

PDB: Protein Data Bank

α -Bgt: α -Bungarotoxina

PNU-120596: 1-(5-Cloro-2,4-dimetoxifenil)-3-(5-metilisoxazol-3-il)urea

NS-1738: N-(5-Cloro-2-hidroxifenil)-N'-(2-cloro-5-(trifluorometil)fenil)urea

HEK293: Células 293 de riñón embrionario humano

SH-SY5Y: Células del neuroblastoma de un tumor óseo metastásico

CONTENIDO

Resumen	11
1. Introducción	13
1.1 Receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR).....	13
1.2 Recetor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ (nAChR $\alpha 7$).....	15
1.3 Sitios de unión molecular del nAChR $\alpha 7$	17
1.3.1 Sitio ortostérico	17
1.3.2 Sitios alostéricos	19
2. Ligandos cannabinoides del nAChR $\alpha 7$	21
3. Importancia de la estructura-actividad de los ligandos en este estudio.....	23
4. Estudios <i>in silico</i>	28
4.1 Softwares para modelado <i>in silico</i>	29
5. Justificación	31
6. Hipótesis	32
7. Objetivos.....	32
7.1 Objetivo General	32
7.2 Objetivos Particulares	32
8. Diagrama de trabajo	33
9. Materiales y Metodología	34
9.1 Cristal para el nAChR $\alpha 7$	34
9.2 Software Schrödinger Maestro	35
9.3 <i>Docking</i> Molecular	36
10. Resultados.....	38
10.1 <i>Docking</i> Molecular sin membrana celular.....	38
10.1.1 Sitio de unión 1 sin membrana.....	40
10.1.1.1 Naturaleza aminoacídica del sitio 1.....	42
10.1.2 Sitio de unión 2 sin membrana.....	49
10.1.2.1 Naturaleza aminoacídica sitio 2.	51
10.1.3 Sitio de unión 3 sin membrana.....	56
10.1.3.1 Naturaleza aminoacídica del sitio 3.....	59
10.2 <i>Docking</i> molecular con membrana celular.....	64
10.2.1 Sitio de unión 1 con membrana.....	64
10.2.2 Sitio de unión 2 con membrana.....	67
10.2.3 Sitio de unión 3 con membrana.....	70

11. Discusión de resultados.....	73
11.1 <i>Docking</i> molecular.....	73
11.1.1 Sitio alósterico 1	76
11.1.2 sitio alósterico 2	79
11.1.3 sito alósterico 3	80
12. Relación estructura-actividad del (-)-CBD y sus análogos.....	82
13. Conclusión	86
14. Perspectivas	87
15. Referencias	88

Resumen

El Cannabidiol ((-)-CBD), un componente terpenoide del *cannabis Sativa L.*, que carece de efectos psicoactivos, ha despertado un gran interés en el ámbito farmacéutico debido a los efectos terapéuticos que aporta en distintas patologías del Sistema Nervioso Central y Periférico. Dado que el (-)-CBD tiene múltiples objetivos terapéuticos y propiedades fisicoquímicas que dificultan su actividad farmacológica, es racional utilizar análogos estructurales de esta molécula para mitigar las inconveniencias farmacológicas que tiene el (-)-CBD y tratar afecciones relacionadas con el SNC y el SNP. Se ha reportado que distintas funcionalizaciones de la estructura química del (-)-CBD presentan afinidad por los mismos receptores donde actúa esta molécula pleiotrópica, un ejemplo sustancial de esto, son los receptores nicotínicos de acetilcolina $\alpha 7$ (nAChR $\alpha 7$). El nAChR $\alpha 7$ es un receptor iónico que se activa por la unión de acetilcolina despolarizando la membrana celular por la entrada de cationes Na^+ y Ca^{+2} al citosol. El receptor se encuentra distribuido en el SNC y el SNP, de igual forma está localizado en células gliales y tiene un papel importante en los trastornos neurológicos, neurodegenerativos e inflamatorios, se debe agregar que, moléculas que presentan afinidad por el nAChR $\alpha 7$ pueden modular la actividad e influir en efectos terapéuticos derivados de dicha interacción. Actualmente se ha reportado que el (-)-CBD y ciertos análogos de esta estructura tienen actividad en el nAChR $\alpha 7$, sin embargo, no se ha comprendido por completo cómo es que se lleva la interacción molecular del (-)-CBD y sus análogos con el nAChR $\alpha 7$, y en qué radica en las funciones biológicas para la modulación de dicho receptor por estructuras similares al (-)-CBD. Por tal motivo, es necesario comprender las interacciones moleculares que subyacen a los efectos beneficiosos y adversos de este grupo de ligandos del nAChR $\alpha 7$. Mediante modelamientos de *docking* molecular con y sin membrana celular, revelamos en este trabajo de tesis como el ligando (-)-CBD y sus análogos funcionan como ligandos del nAChR $\alpha 7$ al presentar 3 principales sitios de modulación alostérica de naturaleza hidrofóbica, de tal manera que conduce a una dependencia entre la energía de afinidad por el sitio de unión y la estructura química del ligando. La unión tiene lugar a través del Dominio Extracelular y se estabiliza principalmente por interacciones moleculares de tipo puente de hidrógeno y π -catión entre el grupo resorcinol del (-)-CBD y sus análogos con los residuos aminoacídicos Lys 109 y Asp 104 de la cara principal (+) del nAChR $\alpha 7$. Asimismo, la presencia de los aminoácidos Gly 105, Pro 103 y Pro 110 son necesarios para acoplar el ligando en los sitios alostéricos. La modulación del nAChR $\alpha 7$ por ligandos estructuralmente similares a la estructura química del (-)-

CBD es de relevancia farmacológica y se debe considerar como un posible modelo para el estudio de la modulación del nAChR $\alpha 7$. Por lo tanto, este trabajo proporciona información detallada de las múltiples interacciones moleculares y los sitios de unión de este conjunto de ligandos del nAChR $\alpha 7$.

1. Introducción

1.1 Receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR)

El receptor nicotínico de acetilcolina, o por sus siglas en inglés nAChR, son receptores iónicos colinérgicos que responden al neurotransmisor endógeno acetilcolina y a la molécula exógena de nicotina, es una proteína transmembranal perteneciente a la superfamilia de receptores activados por ligandos Cys-loop (Albuquerque *et al.*, 2009). Este receptor tiene múltiples funciones fisiológicas, tales como la contracción del músculo esquelético en la unión neuromuscular, la transmisión excitatoria rápida en el SNC y la regulación de la liberación de otros neurotransmisores en el cerebro y la médula espinal a nivel periférico (Albuquerque *et al.*, 2009; Wills *et al.*, 2022).

Se han identificado diferentes genes que codifican 17 subunidades del receptor nicotínico en el genoma de vertebrados, pero únicamente 16 subunidades se expresan en mamíferos (la subunidad $\alpha 8$ sólo fue detectada en aves). La expresión de las subunidades proteicas denominadas α ($\alpha 1$ - $\alpha 10$) se caracterizan por la presencia de un loop de 13 aminoácidos delimitado por un puente disulfuro entre dos cisteínas adyacentes que se encuentra en el sitio de unión del ligando acetilcolina (ACh), característica importante de los receptores Cys loop (Wills *et al.*, 2022). Las subunidades que carecen de la subunidad α ($\beta 1$ - $\beta 4$, γ , δ y ϵ) carecen de dichas cisteínas consecutivas (Albuquerque *et al.*, 2009, Nielsen *et al.*, 2019).

El nAChR adopta diferentes estados, como inactivo, activo o desensibilizado derivado de la unión de ligandos agonistas como ACh o nicotina. La activación de los receptores nicotínicos resulta en una rápida despolarización que involucran la entrada de iones Na^+ y Ca^{2+} hacia el interior de la célula (Nielsen *et al.*, 2019; Wills *et al.*, 2022).

La estructura proteica del nAChR que se representa en la Figura 1, se compone de 5 subunidades (pentámero) que pueden existir de forma homomérica (constituidos por cinco subunidades idénticas) y heteromérica (por dos o más subunidades diferentes) con un peso molecular de ~ 290 kDa (Nielsen *et al.*, 2019). La disposición simétrica de cada subunidad forma un poro iónico con un diámetro de ~ 9 Å y una longitud de ~ 11 Å (Albuquerque *et al.*, 2009).

Cada subunidad del receptor nicotínico posee entre 400-500 aminoácidos distribuidos en tres dominios: un dominio extracelular (ECD), un dominio transmembranal (TMD) y un dominio intracelular (ICD) (Nielsen *et al.*, 2019). Una sola subunidad del nAChR posee un extremo N-terminal extracelular de ~ 200 aminoácidos, seguido por cuatro regiones hidrofóbicas (M1, M2, M3 y M4) separadas por dos loops intracelulares, IC1 e IC2. El loop citoplasmático IC2, que va desde M3 hasta M4, contiene sitios de fosforilación que son cruciales para la regulación del nAChR, este loop además interactúa con proteínas chaperonas, citoesqueléticas y de andamiaje necesarias para el reconocimiento del ambiente lipídico. Después de la región hidrofóbica M4, continúa un extremo C-terminal extracelular (Albuquerque *et al.*, 2009).

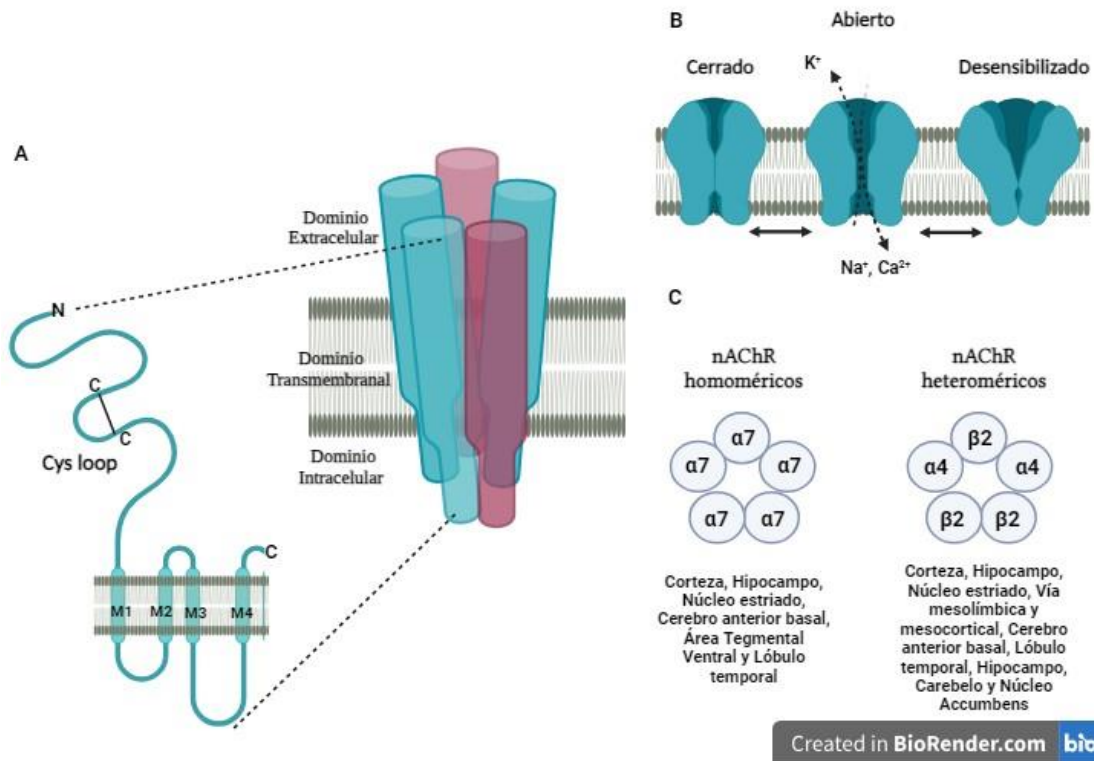


FIGURA 1. Organización pentamérica del receptor nicotínico de acetilcolina. A) Se muestra la estructura de una única subunidad. Cada subunidad tiene un gran dominio extracelular que contiene un puente disulfuro entre dos cisteínas adyacentes (Cys loop). En el dominio transmembranal, existen 4 segmentos (M1-M4) que atraviesan la membrana. Existe un loop intracelular variable entre los segmentos transmembrana M3 y M4 que contiene sitios de fosforilación importantes para la regulación y el tráfico del nAChR. B) Se muestran los tres estados conformacionales para el nAChR. Los estados dependen de la interacción con los ligandos agonistas para la apertura del canal y/o la desensibilización del nAChR. C) Estequiometrías principales del nAChR homopentaméricos o heteropentaméricos. Los círculos blancos indican la variedad de subunidades α y β que a menudo se incorporan en el nAChR.

1.2 Recetor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ (nAChR $\alpha 7$)

El nAChR $\alpha 7$, comúnmente abreviado por sus siglas en inglés nAChR $\alpha 7$, es una proteína alostérica transmembranal del tipo neuronal. Es el único receptor nicotínico que se ensambla fisiológicamente como homopentámero (5 subunidades $\alpha 7$) (Wills *et al.*, 2022).

La entrada de calcio a través del nAChR $\alpha 7$ se asocia con la activación de canales de calcio dependientes de voltaje en neuronas (Mahgoub *et al.*, 2013; Nielsen *et al.* 2019) y en la estimulación de vías antiinflamatorias en el sistema inmunológico (Janneford *et al.*, 2014; Wills *et al.*, 2022; Vallés y Barrantes 2023). De igual forma se ha informado que este receptor ejerce una función de neuromodulador en la liberación presináptica de otros neurotransmisores, incluyendo ácido γ -aminobutírico, glutamato, dopamina y norepinefrina en el SNC (Cheng *et al.*, 2015; Bouzat *et al.*, 2017).

Se ha comprobado que anomalías específicas en el nAChR $\alpha 7$, ya sea por mutaciones genéticas o por un funcionamiento anómalo, ocasiona la formación de conexiones neuronales anómalas que derivan en enfermedades del SNC (Bouzat *et al.*, 2017). Por ejemplo, en la enfermedad de Alzheimer, el péptido beta amiloide ($A\beta$) puede unirse al nAChR $\alpha 7$ en la superficie de las neuronas para formar placas beta amiloide. La internalización endocítica del complejo nAChR $\alpha 7$ - $A\beta$ y la posterior agregación del péptido $A\beta$ promueven la fosforilación de la proteína tau asociada a microtúbulos, lo que conduce a la formación de ovillos neurofibrilares (Vallés and Barrantes 2023)

En cuanto a la estructura proteica del nAChR $\alpha 7$, cuenta con cinco sitios de unión ortostéricos y una afinidad relativamente baja por los ligandos agonistas clásicos ACh y nicotina, sin embargo, es completamente activado por la colina (Ch) y selectivamente bloqueado por la α -bungarotoxina (α -Bgt) al ocupar el sitio de unión del ligando ACh (Nielsen *et al.*, 2019; Vallés y Barrantes 2023). Como se puede ver en la Figura 2, la estructura proteica del nAChR $\alpha 7$ consiste en un ECD, un TMD que componen el canal iónico central y un ICD.

Como se puede ver en la Figura 2, el inciso A muestra el ECD de cada subunidad $\alpha 7$, este dominio está formado por una hélice α corta en el extremo N-terminal, a continuación, se encuentran 10 hojas β plegadas dispuestas en forma antiparalela en una conformación β -sándwich. Estas hojas β

plegadas se dividen en hojas internas ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 5$, $\beta 6$ y $\beta 8$) y externas ($\beta 4$, $\beta 7$, $\beta 9$ y $\beta 10$), dependiendo de su proximidad al eje central del pentámero. Las hojas β plegadas están conectadas entre sí mediante loops numerados del 1 (que conecta la hélice α con la hoja $\beta 1$) al 10 (que conecta las hojas $\beta 9$ y $\beta 10$). El loop 7 que conecta las hojas $\beta 6$ y $\beta 7$, es conocido como "Cys-loop" (Bouzat *et al.*, 2017; Nielsen *et al.*, 2019; Noviello *et al.*, 2021).

En el caso del TMD, se puede ver en la Figura 2 inciso A, que se compone de 4 hélices α que atraviesan perpendicularmente la membrana plasmática, denominadas segmentos o hélices α M1, M2, M3 y M4. En el receptor pentámero, las 20 hélices α totales se disponen en un anillo interno que delimita el poro iónico, formados por los segmentos M2 de las 5 subunidades $\alpha 7$ y un anillo externo que protege las hélices α M2 del contacto con los lípidos de membrana, formado por los segmentos M1, M3 y M4 de las mismas 5 subunidades $\alpha 7$ (Nielsen *et al.*, 2019; Noviello *et al.*, 2021).

Es importante mencionar que el poro iónico, en el estado cerrado, está ocluido por una faja hidrofóbica que crea una constricción estrecha de $\sim 3 \text{ \AA}$, esta faja está generalmente constituida por aminoácidos de leucina (Albuquerque *et al.*, 2009). La importancia de mantener la conservación de aminoácidos hidrófobos en las hélices α M2 se demuestra cuando se sustituyen por aminoácidos hidrófilos ya sea por métodos mutagénicos o en ciertas epilepsias. Estas mutaciones producen un aumento en la permeabilidad del canal de manera no específica (Albuquerque *et al.*, 2009).

La Figura 2 inciso B, muestra como las hélices α M4 de cada subunidad $\alpha 7$ están continuamente en contacto con la bicapa lipídica proyectando un residuo de cisteína altamente conservado necesario para el anclaje del nAChR $\alpha 7$ en las balsas lipídicas, de tal forma que puede interactuar con el colesterol y otras moléculas relacionadas con los lípidos, como los esteroides (Albuquerque *et al.*, 2009). En consecuencia, la manipulación del contenido de lípidos de la membrana o el grado de agregación del receptor tiene el potencial de modificar el mecanismo de activación.

Se puede ver que en la Figura 2 inciso A, el ICD de cada subunidad $\alpha 7$ del receptor nicotínico está dado por el loop M3-M4, cuya estructura principalmente se conforma por dos hélices α denominadas MX y MA. Las hélices MA de las cinco subunidades forman un cono pentagonal invertido a nivel intracelular que contiene residuos aminoacídicos cargados negativamente, principalmente por un anillo formado por residuos aminoacídicos de ácido glutámico (Glu 241)

(Nielsen *et al.*, 2019; Noviello *et al.*, 2021). Esto garantiza el paso selectivo de los cationes a través de portales o ventanas donde pasarían los iones que atraviesan el poro iónico.

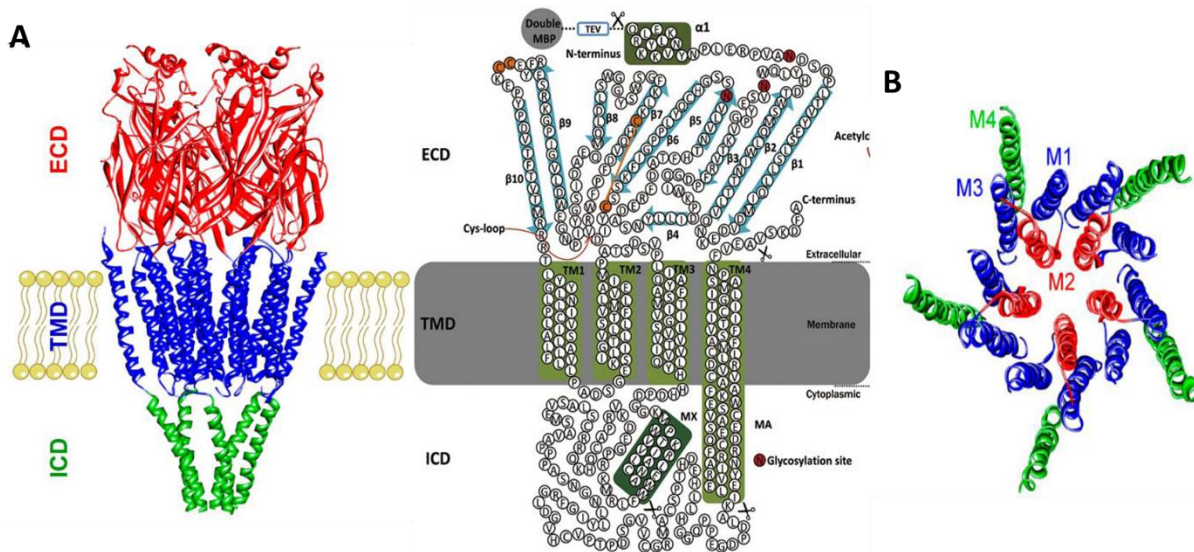


Figura 2. Representación esquemática y topológica del receptor nAChR $\alpha 7$. A) Vista lateral del receptor mostrando los tres dominios estructurales, se presenta el esquema del nAChR $\alpha 7$ en forma de caricatura y la topología de una sola subunidad α del receptor. B) Vista superior del TMD del receptor nACh $\alpha 7$. Se distingue el anillo interno delimitado por M2 que forma el poro iónico central y un anillo externo que lo separa del entorno lipídico, dado por M1 y M3 en la posición intermedia, y M4 en la posición más distal al poro. (Tomado y modificado de Cheng *et al.*, 2015; Nielsen *et al.*, 2019)

1.3 Sitios de unión molecular del nAChR $\alpha 7$

En la estructura proteica del nAChR $\alpha 7$ se pueden identificar distintos sitios topográficos designados para la regulación de la actividad de dicho receptor (Nielsen *et al.*, 2019). La importancia molecular del estudio proteico del nAChR $\alpha 7$ es la identificación de diferentes sitios topográficos de unión que modifican la actividad de dicho receptor. Con base a lo anteriormente mencionado se puede diseñar y estudiar compuestos químicos que puedan imitar la acción de algunos ligandos al modular la actividad del receptor al unirse en estos sitios de unión y mejorar la actividad del nAChR $\alpha 7$ condiciones anómalas (Albuquerque *et al.*, 2009; Bertrand *et al.*, 2008; Bouzat *et al.*, 2017).

1.3.1 Sitio ortostérico

El sitio ortostérico es principal punto de activación del nAChR $\alpha 7$, se encuentra en el dominio ECD cerca del par de residuos de cisteínas adyacentes y es representativo para los ligandos ACh, colina, nicotina y α -bungarotoxina (Albuquerque *et al.*, 2009).

Se debe resaltar la importancia de este sitio de unión ya que es el lugar específico donde la ACh o nicotina se une al nAChR $\alpha 7$, de tal manera que facilita la transformación de una señal química en una señal eléctrica mediante un proceso denominado *gating*. Este proceso implica la reestructuración de los TMD del nAChR $\alpha 7$, lo cual resulta en la activación del poro iónico, promoviendo un movimiento rotacional de las hélices α M2, de tal manera que la faja hidrofóbica se ensancha en aproximadamente 8 Å. Esta rotación es esencial para permitir que los residuos hidrofílicos de las hélices α M2 del dominio transmembranal, estas se orienten hacia el interior del poro iónico, facilitando así el flujo de iones Na^+ y Ca^{2+} hacia el interior de la célula. Este proceso genera una corriente eléctrica que puede desencadenar la propagación de un potencial de acción a largo plazo (Nielsen *et al.*, 2019; Noviello *et al.*, 2021). El mecanismo de transducción de señales que conecta distintos dominios celulares del nAChR $\alpha 7$ se conoce como transición alostérica (Noviello *et al.*, 2021).

Como se observa en la Figura 3, el sitio de unión ortostérico es una cavidad interfacial que se encuentra formado por dos subunidades $\alpha 7$ y está localizado aproximadamente a 40 Å por encima de la superficie transmembranal (Nielsen *et al.*, 2019; Wonnacott 2020).

Al ser un sitio interfacial de 2 subunidades $\alpha 7$, la cara principal del sitio de unión ortostérico es llamada cara (+) y se encuentra en la subunidad $\alpha 7$ que posee el puente disulfuro formado por los 2 residuos de cisteínas adyacentes. La cara (+) aporta 3 loops hidrofóbicos, importantes para la unión del agonista (loops A, B y C) (Albuquerque *et al.*, 2009; Nielsen *et al.*, 2019).

Cuando la molécula ACh o nicotina se une al nAChR $\alpha 7$ se establece una interacción electrostática que permite la activación del receptor. A través de interacciones con la cara (+) entre residuos aminoacídicos del tipo aromático (Tyr 93, Trp 149, Trp 149, Tyr 190 y Tyr 198) y la amina cuaternaria presente en los ligandos agonistas, se forman interacciones del tipo π -catión que estabiliza la unión molecular, es decir, los aminoácidos presentan un sistema rico en electrones π sobre y debajo del anillo aromático, derivando en un cuadrupolo eléctrico (un par de dipolos, que no se cancelan entre sí) implicando una carga parcial negativa de un lado y una carga positiva asociada en el plano donde yacen todos los átomos de hidrógeno. El sistema π cargado negativamente puede interactuar con la densidad electrónica positiva de la amina cuaternaria de los ligandos agonistas, estableciendo así la unión ligando-receptor (Albuquerque *et al.*, 2009; Nielsen *et al.*, 2019; Noviello *et al.*, 2021).

Por otro lado, la subunidad $\alpha 7$ adyacente contribuye a la cara complementaria (-) del sitio de unión ortostérico, proporcionando 3 loops conservados D, E y F. (Wonnacott 2020; Noviello *et al.*, 2021).

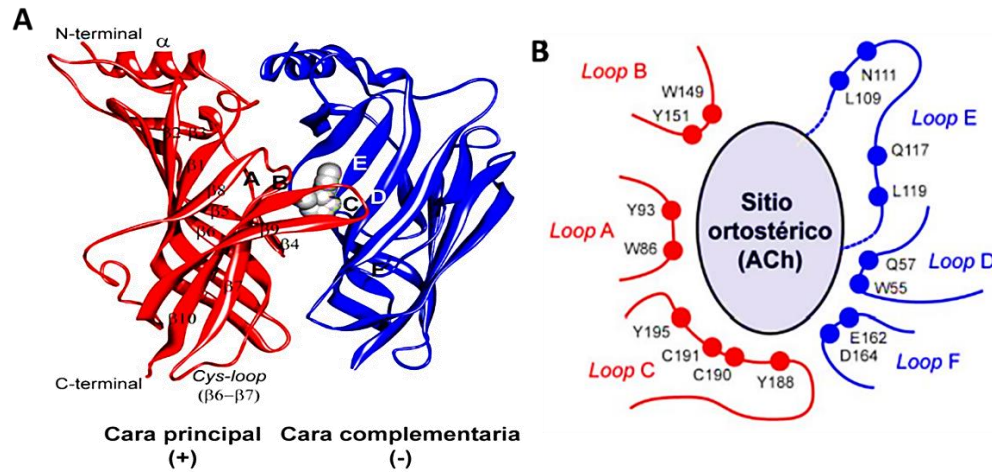


Figura 3. Sitio de unión ortostérico. A) Se muestra un modelo de interfaz entre los ECD de dos subunidades del nAChR $\alpha 7$, basado en la estructura cristalina de un complejo de AChBP. La subunidad en color rojo es la que aporta la cara principal del sitio ortostérico (loops A, B y C). La subunidad en color azul aporta la cara complementaria del sitio ortostérico (loops D, E y F). B) Diagrama del sitio ortostérico de unión de la ACh en el nAChR $\alpha 7$, resaltando los residuos aminoacídicos que interactúan con el agonista. (Tomado de Nielsen *et al.*, 2019)

1.3.2 Sitios alostéricos

Por otro lado, existen otros sitios de modulación para el nAChR $\alpha 7$, que pueden estar distribuidos en distintas partes del receptor, estos sitios son llamados, sitios alostéricos. Como se ve en la Figura 4, el nAChR $\alpha 7$ presenta múltiples sitios alostéricos bien distribuidos en toda la proteína (Nielsen *et al.*, 2019; Wonnacott. 2020). Los ligandos que interactúan con estas regiones pueden afectar los cambios conformacionales de la estructura proteica, controlando de forma positiva o negativa la conversión del canal iónico en presencia o ausencia del neurotransmisor ACh (Bouzat *et al.*, 2017)

Existen diferentes sitios en los que ligandos alostéricos pueden tener actividad molecular, como, por ejemplo:

- a) **Sitio de unión del Ca^{2+} extracelular:** localizados en las interfaces de las subunidades $\alpha 7$, por debajo de los sitios ortostéricos y más cerca de la membrana plasmática. La

entrada de calcio a este sitio puede modular su actividad, afectando la apertura y cierre del poro iónico (Wonnacott 2020).

- b) **Sitios transmembrana intrasubunidad:** localizados dentro de la estructura terciaria de una subunidad $\alpha 7$, este sitio aumenta la activación del receptor inducida por agonistas y retrasando el proceso de desensibilización. Se ha demostrado que el ligando PNU-120596 se une al vestíbulo intrasubunidad situado entre el TMD de una subunidad α , potenciando la respuesta del receptor a la acetilcolina u otros agonistas, lo que significa que aumenta la actividad del receptor cuando está presente. (Bertrand *et al.*, 2008; Bouzat *et al.*, 2017).
- c) **Sitios transmembrana intersubunidad:** este sitio se encuentra formado por la interfaz de dos subunidades $\alpha 7$, ubicado en el TMD que comprende las regiones hidrofóbicas M3-M1. Un ejemplo circunstancial es la ivermectina, ya que se une entre los dominios transmembrana M3 y M1 de subunidades adyacentes, hacia la cara extracelular de la membrana, y en estrecha posición con el dominio M2 que recubre el canal iónico potenciando la apertura del poro iónico (Bertrand *et al.*, 2008; Wonnacott 2020).
- d) **Sitios cerca del C-terminal extracelular:** el sitio se encuentra cerca del C-terminal de una subunidad $\alpha 7$, facilitando la interacción con el bucle Cys para mejorar la apertura del canal (Wonnacott 2020).

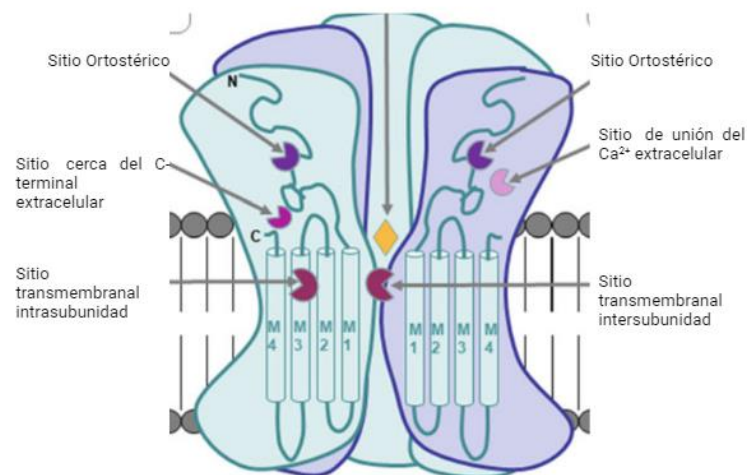


Figura 4. Representación esquemática de los sitios de unión de ligandos alostéricos del nAChR $\alpha 7$ (Tomado y modificado de Wonnacott 2020).

2. Ligandos cannabinoides del nAChR $\alpha 7$

El término cannabinoide se utiliza para describir cualquier compuesto químico, sin importar su procedencia o composición, que se une a los receptores cannabinoides CB1 y CB2 (Li *et al.*, 2020; Ubeed *et al.*, 2022). Desde épocas antiguas, se ha propuesto el uso de cannabinoides, extraídos de la planta *Cannabis sativa L.*, como alternativa en el tratamiento de diversos trastornos del SNC (Patricio *et al.*, 2020; Oz *et al.*, 2022).

En los últimos años, la cantidad de compuestos naturales descubiertos o aislados de *Cannabis sativa L.* ha seguido creciendo. Se han identificado más de 320 compuestos fitoquímicos en el cannabis, de los cuales 125 son cannabinoides y 198 no pertenecen a esta categoría (Ubeed *et al.*, 2022).

En la actualidad, se ha demostrado que el Cannabidiol ((-)-CBD), un fitocannabinoide no psicotrópico, presenta efectos pleiotrópicos al interactuar con distintas dianas farmacológicas, por ejemplo, los receptores D1, D2, PPAR γ , TRPV1, GPR55, 5-HT1A, A2A (Patricio *et al.*, 2020) y recientemente con el nAChR $\alpha 7$ (Mahgoub *et al.*, 2013; Chrestia *et al.*, 2022). De tal manera que la actividad pleiotrópica del (-)-CBD puede interpretarse como una dificultad para entender el papel específico de un blanco farmacológico, o como una ventaja en cuestión de beneficios terapéuticos que pueda proporcionar el Cannabidiol (Li *et al.*, 2020; Patricio *et al.*, 2020; Zagzoog *et al.*, 2020).

La relación que existe entre el (-)-CBD y el nAChR $\alpha 7$ podría tener un impacto en el funcionamiento del receptor, lo que podría derivar en beneficios terapéuticos para el tratamiento de afecciones asociadas este mismo (Oz *et al.*, 2022).

- **(-)-CBD (Cannabidiol)**

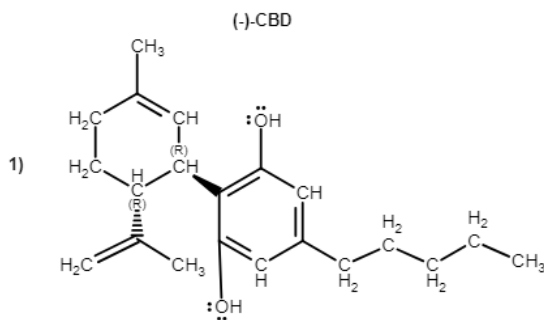


Figura 5. Estructura, nombre y fórmula química del (-)-CBD.

Se ha reportado que el 2-[(1'R,6'R)-6'-isopropenil-3'-metilciclohex-2'-en-1'-il]-5-pentilbenzeno-1,3-diol, conocido como (-)-CBD tiene la capacidad de modificar la conductancia de los flujos de calcio en el nAChR $\alpha 7$ expresados en *ovocitos* de ranas *xenopus* (Mahgoub *et al.*, 2013). En experimentos *patch clamp* de interneuronas de hipocampo CA1 de ratas el (-)-CBD disminuye las corrientes evocadas por la colina (con un IC50 de 11,3 μ M) (Mahgoub *et al.*, 2013), este valor es significativo para poder inhibir al 50% la actividad del nAChR $\alpha 7$. De igual forma se comprobó que el (-)-CBD tiene la capacidad de reducir la liberación de norepinefrina inducida por nicotina en secciones de hipocampo CA1 de ratas (Mahgoub *et al.*, 2013), la liberación de norepinefrina provocada por la nicotina se utiliza para evaluar indirectamente la función del nAChR $\alpha 7$ presináptico.

En 2022, Chrestia y colaboradores reportaron, a través de experimentos en células BOSC-23 derivadas de células HEK-293 que expresaban al nAChR $\alpha 7$, que el (-)-CBD tiene un efecto inhibitorio en la actividad del canal iónico de este receptor, con una IC50 de $0,53 \pm 0,14 \mu$ M. Además, el (-)-CBD modula negativamente la función metabotrópica del nAChR $\alpha 7$, lo que se refleja en una marcada disminución en las concentraciones de calcio celular inducidas por ACh (Chrestia *et al.*, 2022). En presencia de un modulador alostérico positivo como el PNU-120596, el (-)-CBD altera la apertura del canal iónico mediante la estabilización del estado de reposo cerrado y/o la estabilización del estado desensibilizado e insensible a PNU-120596 (Chrestia *et al.*, 2022). Esto implica que el (-)-CBD actúa como modulador negativo en presencia de PAM en el nAChR $\alpha 7$.

Hasta el momento no se ha dilucidado por completo como interactúa el (-)-CBD en el nAChR $\alpha 7$, se ha reportado que pudiese ser a través de una vía de membrana, sin embargo, no se ha confirmado nada al respecto (Chrestia *et al.*, 2022).

No obstante, al analizar los mecanismos de acción del (-)-CBD, se puede anticipar su posible eficacia en distintas enfermedades relacionadas con el nAChR $\alpha 7$ (Patricio *et al.*, 2020; Oz *et al.*, 2022). Por este motivo, el estudio de la actividad del nAChR $\alpha 7$ con el (-)-CBD se ha convertido en uno de los principales intereses de la industria farmacéutica y de la investigación biomédica académica (Burstein, 2015; Chrestia *et al.*, 2022; Oz *et al.*, 2022).

3. Importancia de la estructura-actividad de los ligandos en este estudio

Desde que se identificó el potencial terapéutico del (-)-CBD para el tratamiento de diversas afecciones del SNC, ha sido centro de estudio de múltiples asociaciones médicas, académicas e industriales (Ubeed *et al.*, 2022). Sin embargo, debido a la inestabilidad química, baja biodisponibilidad, actividad pleiotrópica y naturaleza hidrófoba del (-)-CBD, diversos investigadores han optado por estudiar análogos estructurales de esta molécula que puedan ser utilizados en el tratamiento de patologías asociadas con el nAChR $\alpha 7$. Estos compuestos incluyen metabolitos, isómeros naturales y derivados sintéticos.

Actualmente se ha reportado que distintas funcionalizaciones de la estructura química del (-)-CBD, deriva en una posible actividad molecular en el nAChR $\alpha 7$, contribuyendo así en efectos farmacológicos antiinflamatorios, neuroprotectores, antinociceptivos y antioxidativos (Bisogno *et al.*, 2001; Burstein, 2015; Li *et al.*, 2020; Zagzoog *et al.*, 2020; Mirlohi *et al.*, 2022).

Los ligandos que producen este tipo de actividades son los siguientes:

- (-)-CBDA (Ácido Cannabidiólico)

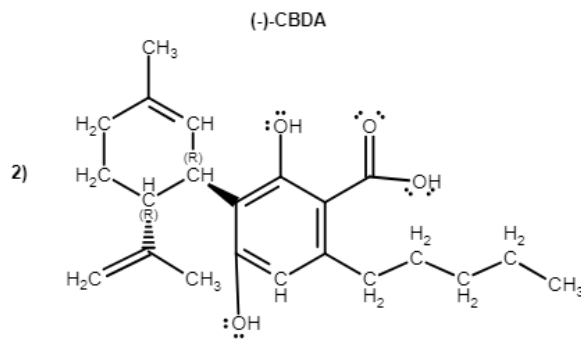


Figura 6. Estructura, nombre y fórmula química del (-)-CBDA.

En 2023, Kim y colaboradores, reportaron que el ácido 3-[(1'R,6'R)-6'-isopropenil-3'-metilciclohex-2-en-1'-il]-6-pentil-2,4-dihidroxibenzoico o mejor conocido como ácido cannabidiólico ((-)-CBDA), mejora la memoria y la actividad cognitiva en un modelo similar a la enfermedad de Alzheimer en un modelo *in vitro* e *in vivo* (ratones tratados con una inyección unilateral de $A\beta_{1-42}$ en el hipocampo). Los ratones tratados con (-)-CBDA mostraron una disminución de acumulación de $A\beta$ y de p-tau en el hipocampo, además de una función cognitiva superior en comparación con los ratones tratados solamente con $A\beta_{1-42}$. Asimismo, el (-)-CBDA

inhibía la entrada de calcio al actuar como antagonistas de los canales dependientes de calcio de tipo T, exhibiendo efectos neuroprotectores en las neuronas (Kim *et al.*, 2023).

- (-)-CBDV (Cannabidivarina) y (-)-CBDVA (Ácido Cannabidivarínico)

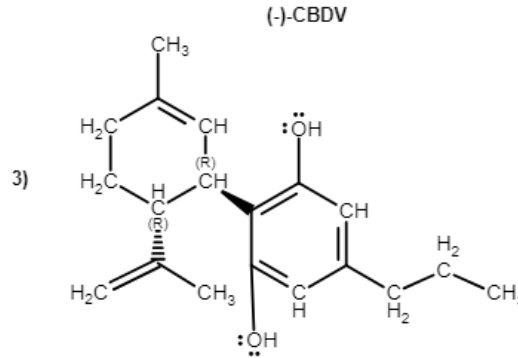


Figura 7. Estructura, nombre y fórmula química del (-)-CBDV.

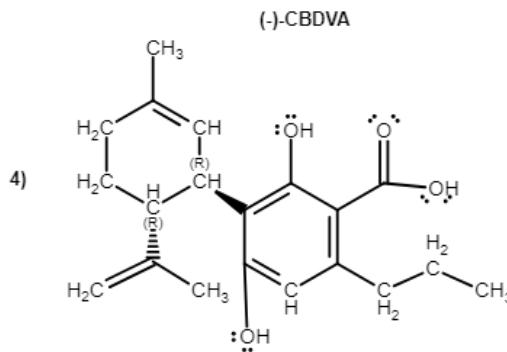


Figura 8. Estructura, nombre y fórmula química del (-)-CBDVA.

Otros estudios realizados en 2023 por Mirlohi y colaboradores, demostraron en el año 2022 que los compuestos 2-[(1R,6R)-6-isopropenil-3-metilciclohex-2-en-1-il]-5-propilbenzo-1,3-diol conocido como cannabidivarina ((-)-CBDV) y el ácido 3-[(1'R,6'R)-6'-isopropenil-3'-metilciclohex-2'-en-1'-il]-6-propil-2,4-dihidroxibenzoico conocido como (-)-CBDVA en una concentración de 10 μ M, pueden alterar el potencial de membrana a potenciales más negativos, inhibiendo la actividad de los canales de calcio tipo T en células HEK293 que expresaban dichos canales (Mirlohi *et al.*, 2023). Los hallazgos respaldan la viabilidad de los fitocannabinoides como herramientas farmacológicas para estudiar las diferencias en los sitios de unión de fármacos en los canales de calcio tipo T y otros canales iónicos.

- **(-)-CBE-C5 (Cannabielsoína)**

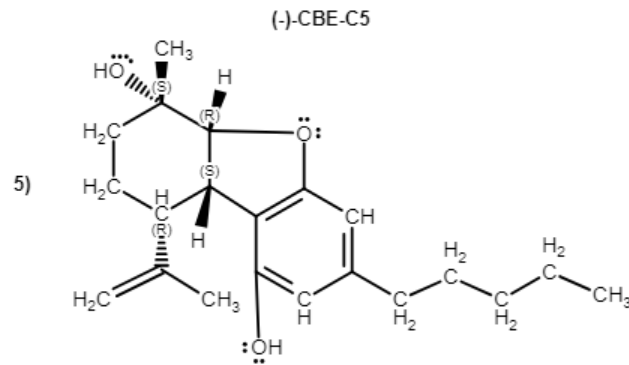


Figura 9. Estructura, nombre y fórmula química de la (-)-CBE-C5.

Dennis y colaboradores en el 2022 demostraron que el (5aS,6S,9R,9aR) -6-metil-3-pentil-9-prop-1-en-2-il-7,8,9,9a-tetrahidro-5aH-dibenzofurano-1,6-diol conocido como cannabielsoína (-) CBE-C5, exhibía efectos antiinflamatorios al disminuir la producción de óxido nítrico (NO) y la citocina proinflamatoria interleucina-6 (IL-6) al mismo tiempo aumenta la producción de la citocina antiinflamatoria (IL-10) en células microgliales BV₂ (Dennis *et al.*, 2022).

- **(-)-CBDM (Cannabidiol mono metil éter) y (-)-CBND (Cannabinodiol)**

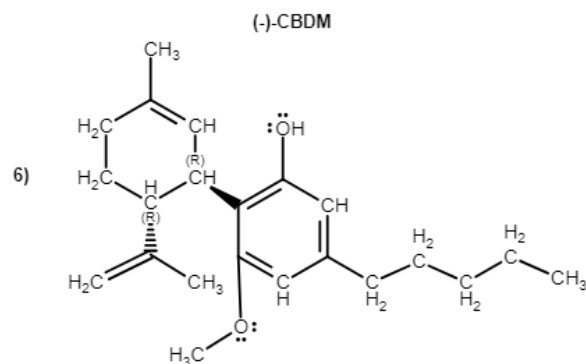


Figura 10. Estructura, nombre y fórmula química del (-)-CBDM.

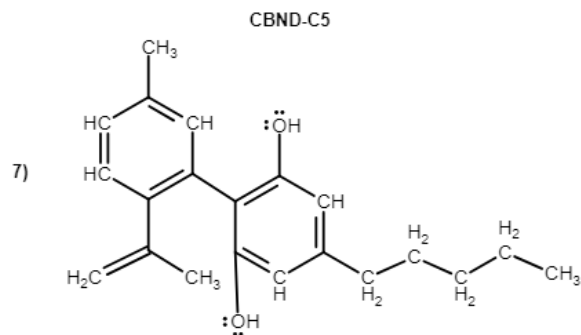


Figura 11. Estructura, nombre y formula química del (-)-CBND.

En 2021, Li Y. y su equipo realizaron una investigación detallada empleando técnicas de modelado *in silico* en el contexto de la epilepsia. En este estudio se analizó un conjunto de 360 compuestos, de los cuales 226 demostraron ser componentes activos del cannabis. El análisis indicó que estas estructuras químicas podrían tener efectos antiepilépticos al influir en diversas vías, como la vía de señalización del calcio regulada por los canales de calcio tipo T. Se debe destacar la participación del 3-metoxi-2-[(1'R,6'R)-6'-isopropenil-3'-metilciclohex-2'-en-1'-il]-5-pentilfenol conocido como (-)-CBDM, y del 2-(5'-metil-2'-prop-1'-en-2'-ilfenil)-5-pentilbenceno-1,3-diol o Cannabinodiol-C5 (CBND-C5) (Li *et al.*, 2021).

- **(-)-CBD Abn (Cannabidiol Abnormal)**

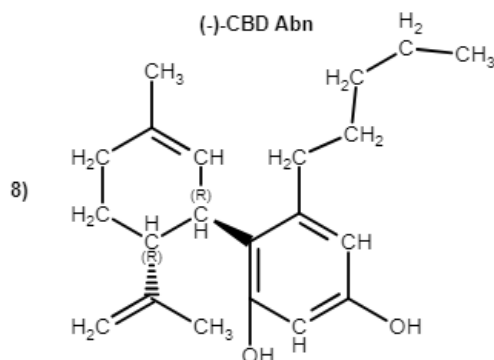


Figura 12. Estructura, nombre y formula química del (-)-CBD Abn.

En el caso del 4-[(1'R,6'R)-6'-isopropenil-3'-metilciclohex-2'-en-1'-il]-5-pentilbenceno-1,3-diol o (-)-CBD Abn, Janefjord y colaboradores reportaron en el año 2014, que este cannabinoide producía una neuroprotección directa contra la toxicidad mediada por $A\beta_{1-42}$, en células de neuroblastoma (SH-SY5Y) inhibiendo la neurotoxicidad activada por la microglía (células BV-2) (Janefjord *et al.*, 2014). En estudios posteriores, Cardinal von Widdern y colaboradores,

demonstraron en el año 2020 que a diferentes concentraciones de (-)-CBD Abn, se puede modular la activación de las células gliales al alterar diferencialmente la secreción de mediadores proinflamatorios (IL-6), además de reducir la producción de óxido nítrico y TNF α , esto fue probado a través de cultivos celulares de astrocitos-microgliales de ratones neonatales C57BL-6 y ratones knockout (Von Widdern *et al.*, 2020).

Los autores destacan en su discusión de resultados que existe una incertidumbre sobre los mecanismos celulares y moleculares para llevar a cabo esta acción del (-)-CBD Abn, sin embargo, se ha reportado que la activación del nAChR α 7 en células gliales regula la síntesis y liberación del TNF α , IL-6 y óxido nítrico (Vallés y Barrantes. 2023).

Con las evidencias anteriores del ligando (-)-CBD Abn se puede estimar que existe la participación del nAChR α 7 expresados en astrocitos y microglía. De esta manera se modulan diversas moléculas inflamatorias que pueden provocar neurodegeneración (Von Widdern *et al.*, 2020).

- **(-)-CBM (Cannabimovona)**

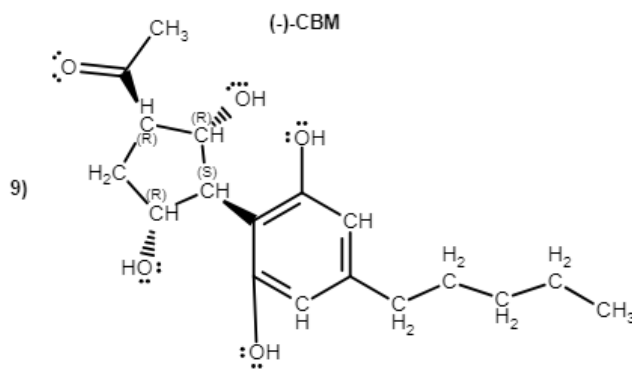


Figura 13. Estructura, nombre y fórmula química del (-)-CBM.

Dennis y colaboradores, reportaron en el 2023 que el 1-[(1R,2R,3S,4R)-3-(2,6-dihidroxi-4-pentilfenil)-2-hidroxi-4-prop-1-en-2-ilciclopentil]etanona o (-)-CBM es una sustancia con propiedades antiinflamatorias al reducir la concentración de óxido nítrico en células microglías BV₂. El mecanismo molecular del (-)-CBM es activar completamente al receptor PPAR γ (receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas). En la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas existe un estado inflamatorio crónico asociado a la disfunción del nAChR α 7 expresado en células gliales del SNC, por lo que la modulación por (-)-CBM puede contribuir a reducir la neuro inflamación (Dennis *et al.*, 2022).

En resumen, se ha demostrado que la funcionalización de la estructura química del (-)-CBD puede desembocar en un tipo de cribado virtual, fungiendo como filtro computacional para la elección de estructuras químicas accesibles en bases de datos científicos. El uso normalmente que les dan a estas moléculas es de investigación preclínica y clínica, con la finalidad de poder encontrar posibles fármacos. En este estudio el cribado se centró únicamente en compuestos que sean análogos a la estructura química del (-)-CBD con variaciones estructurales conocidas o informadas en la literatura con la posible actividad en el nAChR $\alpha 7$. Es así como el cribado da la relación estructura-actividad permite predecir posibles ligandos que deriven en un blanco terapéutico específico (Williams and Lemke. 2002).

4. Estudios *in silico*

El avance de la era digital ha revolucionado la perspectiva de estudio en todas las disciplinas científicas, incluyendo el área de la salud. La digitalización de procesos ha permitido nuevas formas de investigar diferentes enfermedades, mediante el uso de modelos *in silico*. El nombre de modelos *in silico* hace alusión a la estructura interna del computador que está hecho en un 90% de materiales de sílice.

Los estudios *in silico* pertenecen a una rama de la biología computacional cuyo objetivo es explorar y experimentar procesos biológicos por medio de simulaciones hechas en computadora. Este nuevo enfoque digital ha permitido visualizar las estructuras tridimensionales de numerosos péptidos, observar el rol y función de diferentes moléculas y proteínas hasta poder llegar a predecir respuestas ante diferentes estímulos (Duran 2021).

La aplicación de esta tecnología es en el área de farmacología, ya que ayuda no solo a predecir la eficacia de posibles moléculas terapéuticas sino también provee modelos del comportamiento farmacocinético de dichos compuestos, es decir, su perfil ADME (absorción, distribución, metabolismo y eliminación). Esta visión brinda un medio para acelerar el ritmo de producción de nuevas sustancias con aplicación clínica, al mismo tiempo garantiza una mayor seguridad y eficacia en los experimentos de desarrollo de nuevos fármacos que resulten perjudiciales o bien inaccesibles e inapropiados para la vida. (Lozano y Scior 2014).

En relación con el nAChR $\alpha 7$, los modelos computacionales han proporcionado una evaluación minuciosa del proceso de apertura del canal iónico, mostrando las variaciones en los mecanismos

de modulación, al dirigir diferentes ligandos en sitios específicos de la estructura proteica del receptor (Noviello *et al.*, 2021).

En conclusión, los modelos computacionales *in silico* buscan optimizar y examinar compuestos químicos como potenciales fármacos al prever su afinidad y selectividad hacia un blanco farmacológico específico, esto lo hacen a través de interacciones moleculares entre los átomos que componen el ligando y el blanco terapéutico de interés (Duran 2021; Lozano y Scior 2014). Los estudios *in silico* abren nuevas oportunidades para investigar y analizar la dinámica de distintas dianas farmacológicas.

4.1 Softwares para modelado *in silico*

En la actualidad se pueden encontrar alrededor de unas 30 implementaciones para la simulación de la interacción ligando-receptor, dichas implementaciones se dividen por sus funciones en acoplamiento Proteína-Ligando y acoplamiento Proteína-Proteína (Duran 2021).

Las simulaciones de la interacción ligando-receptor se hacen a través de diversas técnicas *in silico*, como el *docking* molecular, esta es una técnica de gran utilidad para predecir la estructura de los complejos intermoleculares que se establecen entre dos o más moléculas (Duran 2021). El procedimiento para poder estudiar este tipo de modelos por *docking*, es tener en cuenta que es una interacción entre dos o más moléculas de distinta naturaleza. Por tal motivo, se necesita de una diana o blanco terapéutico de interés y de un grupo de ligandos que puedan tener actividad en dicha diana, de tal manera que puedan afectar su función molecular y repercutir en una función biológica específica. Una vez recopilada esta información, es llevado a cabo el análisis de la interacción molecular entre la diana y los ligandos a través de softwares bioinformáticos que predicen la unión y la estabilización de los ligandos en la estructura tridimensional de la diana terapéutica.

De acuerdo con la Tabla 1. Existen diferentes softwares bioinformáticos que pueden estudiar las interacciones moleculares receptor-ligando, en este estudio se optó por usar el software Schrödinger Maestro por las múltiples ventajas que ofrecía sobre otros softwares bioinformáticos. No obstante, el propósito de todos los softwares bioinformáticos de la Tabla 1 son el estudio de la interacción molecular entre el blanco o blancos terapéuticos con un grupo de moléculas con posible actividad biológica.

Tabla 1. Comparación de softwares bioinformáticas

Software	Función	Descripción
Schrödinger Maestro	Interfaz unificada con herramientas avanzadas para el modelado de interacciones moleculares.	La plataforma es capaz de analizar interacciones moleculares en una interfaz ciega, puede modelar membrana celular, y crear condiciones fisiológicas de pH y de solvatación. Su función empírica de puntuación tiene en cuenta la entropía, de puentes de hidrógeno, iónicos, aromáticos y términos lipofílicos.
Viewer WebChem	Visualización de fármacos basados en estructuras químicas.	Visualizador de uso gratuito que permite estudiar las interacciones moleculares de forma completa.
JChem instant	Interfaz sencilla para gestionar bases de datos moleculares.	Herramienta gratuita de visualización y dibujo de moléculas, basada en una base de datos para el descubrimiento de nuevos fármacos.
GOLD	Interfaz que usa código genético del Cambridge Structural Database.	Herramienta que permite estudiar interacciones moleculares entre proteínas y ligandos, basada en un algoritmo genético y un campo de fuerza basado en la función de puntuación.
Autodock	Interfaz sencilla pero unificada para el estudio estructural de biomoléculas.	Plataforma que usa un algoritmo genético lamarckiano que se combina con una función de puntuación basada en el campo de fuerza AMBER.

5. Justificación

La importancia fisiológica del nAChR $\alpha 7$ es la participación en la neurogénesis, el crecimiento de neuritas y la maduración sináptica. En patologías neurodegenerativas, se ha observado alteraciones en la función del nAChR $\alpha 7$ que afectan a los circuitos de señalización neuronal. No obstante, el estudio de la estructura proteica del nAChR $\alpha 7$ ha sentado las bases para la regulación o mitigación de las anomalías relacionadas con su disfunción mediante el uso de compuestos químicos, que puedan mejorar la función de dicho receptor.

El Cannabidiol ((-)-CBD), un compuesto capaz de regular la actividad del nAChR $\alpha 7$, enfrenta desafíos farmacológicos debido a sus propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas y farmacodinámicas. Por esta razón, se busca explorar nuevas sustancias químicas con efectos moduladores que puedan ser útiles clínicamente para corregir las disfunciones asociadas a este receptor iónico. De acuerdo con los datos recopilados por este trabajo de tesis en cuestión del cribado virtual de la estructura química del (-)-CBD en función de la actividad biológica reportada en el nAChR $\alpha 7$, se puede notar una relación entre las diferentes funcionalizaciones de la estructura del (-)-CBD y la actividad biológica asociada a este receptor, si se estudia esta información mediante un enfoque *in silico*, se puede obtener información valiosa acerca de las interacciones moleculares que rigen este tipo de efectos terapéuticos.

Hasta el momento, no se ha llevado a cabo ninguna investigación *in silico* que relacione los datos obtenidos de los experimentos *in vivo* e *in vitro* sobre la actividad molecular que tiene el receptor nAChR $\alpha 7$ en relación con el (-)-CBD y sus análogos. Por lo tanto, la siguiente tesis esta apuntalada para analizar la interacción del (-)-CBD y sus análogos en el nAChR $\alpha 7$ haciendo uso del *docking* molecular. La información recopilada incluirá, sitios de interacción para cada ligando en el receptor, enlaces formados entre el ligando y el receptor, aminoácidos clave para la interacción y la afinidad de cada ligando al variar la estructura química.

Se propone que este estudio teórico de interacción molecular sirva como modelo de modulación para la actividad del nAChR $\alpha 7$, siempre y cuando se utilicen estructuras químicas derivadas del Cannabidiol.

6. Hipótesis

La evidencia de unión de ligandos cannabinoides como el (-)-CBD y sus análogos al nAChR $\alpha 7$ es reflejo de una distribución aleatoria de sitios de unión ubicados en el dominio transmembranal del nAChR $\alpha 7$, esta distribución es consecuencia de distintas interacciones moleculares que intervienen en la afinidad de cada cannabinoide por el sitio de unión. A través de simulaciones *in silico*, se puede analizar la interacción molecular de este conjunto de ligandos del nAChR $\alpha 7$.

7. Objetivos

7.1 Objetivo General

Explorar la interacción molecular del (-)-CBD y sus análogos como ligandos del nAChR $\alpha 7$, a través de modelados *in silico*.

7.2 Objetivos Particulares

- Describir la interacción molecular del nAChR $\alpha 7$ con el (-)-CBD y sus análogos por medio del *docking* molecular sin membrana utilizando el software Schrödinger Maestro.
- Describir la interacción molecular del nAChR $\alpha 7$ con los estereoisómeros del Cannabidiol debido a que son moléculas con mayor investigación clínica, preclínica e *in silico*, por medio del *docking* molecular con membrana utilizando el software Schrödinger Maestro.

8. Diagrama de trabajo

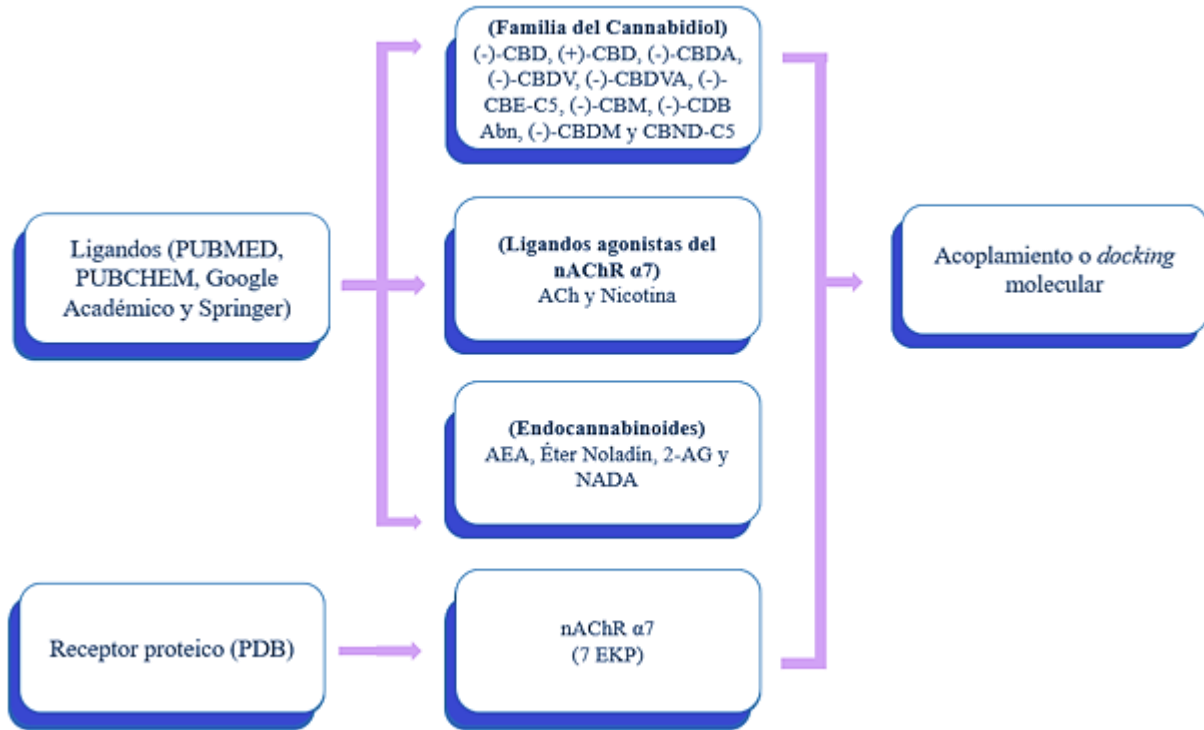


Figura 14. Esquema de trabajo para el estudio *in silico* del nAChR $\alpha 7$ con cannabinoides.

Como se puede ver en la Figura 14, se necesita del cristal del nAChR $\alpha 7$ obtenido de PDB y de las estructuras químicas de los ligandos para poder hacer un estudio *in silico*.

9. Materiales y Metodología

El principal enfoque de este proyecto implica la interacción molecular ligando-receptor mediante la técnica de *docking* molecular, para esto es necesario la interacción de las estructuras químicas de los compuestos de interés (apartado 3) con la estructura cristalina del nAChR $\alpha 7$.

9.1 Cristal para el nAChR $\alpha 7$

Como ya se tenía seleccionado el grupo de ligandos para la interacción molecular ligando-receptor. Lo que continuaba era encontrar un cristal adecuado para el *docking* molecular. Por tal motivo, se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica en el sitio electrónico *Protein Data Bank* (PDB) con el fin de seleccionar un cristal adecuado para el nAChR $\alpha 7$. Los criterios utilizados para seleccionar la calidad del cristal fueron los siguientes:

- a) clashscore: indica el número de pares de átomos en el modelo que están inusualmente cerca entre sí.
- b) Ramachandran outliers: indica ángulos torcidos o muy lejanos de 2 enlaces peptídicos.
- c) sidechain outliers; muestra la cadena de aminoácidos que no tienen ángulos torcidos o atípicos.

Estos criterios fueron tomados según los métodos actuales para la validación de estructuras depositadas en el PDB.

Como se puede observar en la Figura 15, se determinó que la estructura cristalográfica del nAChR $\alpha 7$ más adecuada para este estudio de tesis es el código PDB: 7EKP. La resolución de esta proteína es de 2.85 Å y su caracterización se realizó mediante microscopía electrónica (Zhao, Y. *et al.*, 2021).

La Figura 15 muestra al nAChR $\alpha 7$ seleccionado para este trabajo de tesis, este receptor está compuesto por 5 subunidades $\alpha 7$, cada una contiene hélices alfa de color rojo y láminas beta plegadas antiparalelas de color azul. En la representación se pueden observar los tres dominios proteicos principales del nAChR $\alpha 7$ (ECD, TMD y ICD) y la interfaz de la región de acoplamiento (RA), esta región está compuesta por alrededor del 25% de las hélices α localizadas en el dominio

transmembrana de cada subunidad $\alpha 7$, las cuales se extienden más allá de la superficie de la membrana extracelular (Nielsen *et al.*, 2019).

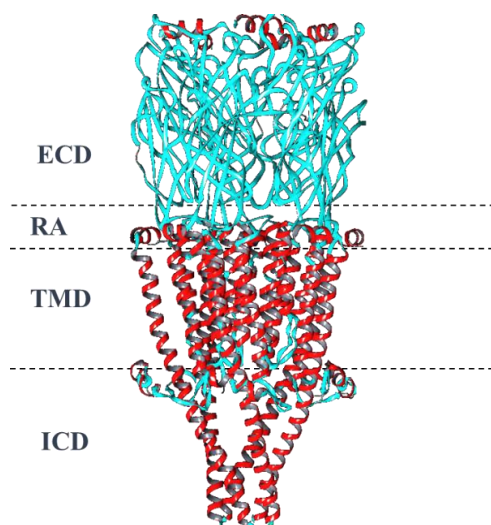


Figura 15. Esquema proteico del nAChR $\alpha 7$ (Zhao, Y. *et al.*, 2021; PDB ID: 7EKP). El receptor nAChR $\alpha 7$ está compuesto por 5 subunidades $\alpha 7$, cada una contiene hélices alfa de color rojo y láminas beta plegadas antiparalelas de color azul. En la representación se pueden observar los tres dominios proteicos principales del nAChR $\alpha 7$, siendo el dominio extracelular (ECD), dominio transmembranal (TMD) y un dominio intracelular (ICD), además de la región de acoplamiento (RA).

9.2 Software Schrödinger Maestro

El software que se utiliza para simular las interacciones moleculares entre los ligandos cannabinoides y el nAChR $\alpha 7$ es el software Schrödinger Maestro. El software de licencia original se encuentra en la computadora matriz del Laboratorio de Elucidación y Síntesis de Química Orgánica-ICUAP. La visualización y la interpretación de las interacciones moleculares se apreció con el empleo del visualizador Free Maestro, del Laboratorio de Neurofarmacología-BUAP.

El software Schrödinger Maestro es una biblioteca de software de código abierto basada en Python que permite la simulación numérica de la ecuación de Schrödinger lineal o no lineal dependiente del tiempo en una y dos dimensiones haciendo uso de la transformada de Fourier. El software usa la física clásica y cuántica para predecir el valor de unión de un ligando o ligandos en un determinado sitio de unión para una proteína objetivo. Generalmente usa un algoritmo de precisión estándar (SP) tipo Monte Carlo con el cual se estudia la teoría de perturbaciones de energía libre para predicciones precisas de afinidad. De igual forma utiliza un muestreo de ligando tratado como flexible.

El software toma en cuenta variables como campos de fuerza, modelos de solvatación precisos, energías de conformación para moléculas y proteínas al incluir variaciones tautoméricas, estereoquímicas y de ionización, así como minimización de energía y filtros flexibles dependiendo del estado de agregación de la materia estudiada.

9.3 *Docking* Molecular

Con la información anteriormente recopilada se puede empezar el estudio de *docking* molecular. En el *docking* molecular, se prepara la estructura cristalina del nAChR $\alpha 7$ en su forma pentamérica, empleando el módulo *Protein Preparation Wizard* de la plataforma Schrödinger Maestro. Se utiliza con la intención de corregir la falta de átomos de hidrógeno, cadenas laterales y loops incompletos, estados de protonación ambiguos y residuos invertidos del receptor. Además, se añadieron átomos de hidrógeno a la proteína para devolverla a su estado original. Los estados de protonación y tautoméricos de Asp, Glu, Arg, Lys e His se ajustaron a un pH fisiológico de 7.4.

Después fue necesario optimizar los ligandos en su conformación de menor energía. Esto se logró mediante el uso del módulo *LigPrep* de Maestro, generando así un conjunto de estructuras moleculares 3D precisas con energías de conformación minimizadas. Tras generar las estructuras 3D, se prepararon los campos de fuerza OPLS4 y las cargas en todas las etapas. Se calcularon todos los centros protonados y estados de ionización posibles para el andamiaje utilizando un ionizador a un pH de 7.4.

Por ultimo, para el acoplamiento molecular se empleó el módulo *Glide* de Maestro. El objetivo de *Glide* es clasificar semicuantitativamente la capacidad de todos ligandos candidatos para unirse a una conformación específica del receptor nAChR $\alpha 7$.

La afinidad de los ligandos con el receptor se evaluó utilizando el *docking score*, lo cual ayuda a minimizar la posibilidad de obtener resultados incorrectos.

De acuerdo con la Figura 15, el propósito del *docking* molecular es analizar la capacidad del ligando (-)-CBD y sus análogos para unirse a una conformación específica del nAChR $\alpha 7$.

El estudio se llevó a cabo en un modelo con y sin membrana celular, con el objetivo de evaluar si la unión de los ligandos al receptor es afectada por la presencia de la membrana celular. La membrana utilizada está compuesta por 1-pamitoil-2-oleil-sn-glicerol-3-fosfocolina (POPC). Se

elegio la membrana POPC debido a la disponibilidad de datos experimentales que existe sobre membranas biofísicas constituidas con este fosfolípido en la base de datos del software Schrödinger Maestro.

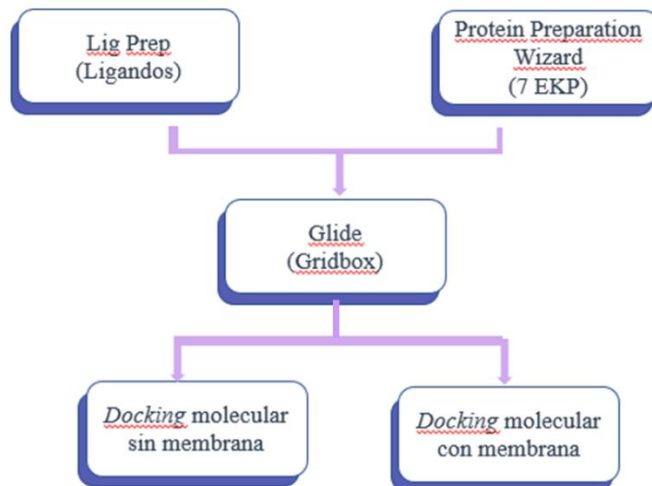


Figura 15. Esquema para realizar el acoplamiento.

Según se ilustra en la Figura 16, para localizar con facilidad el sitio de unión del ligando en el receptor pentamérico usado por este trabajo de tesis, se asignó un color específico para identificar a cada subunidad $\alpha 7$ que conforma el nAChR $\alpha 7$ y de esta manera ubicar de mejor forma el sitio de unión.

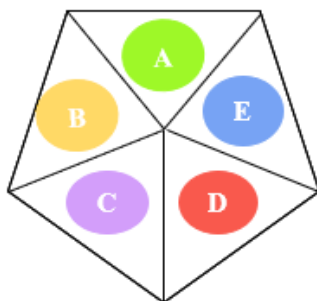


Figura 16. Representación y distribución pentamérica de cada hélice $\alpha 7$ del nAChR $\alpha 7$ (7 EKP). Se puede observar que la organización estructural es en sentido antihorario, que va desde la subunidad $\alpha 7$ A de color verde hasta la subunidad $\alpha 7$ E de color azul.

10. Resultados

10.1 Docking Molecular sin membrana celular.

Con el propósito de examinar un sistema previamente no explorado, se llevó a cabo un *docking* ciego, con el fin de anticipar las posibles ubicaciones de unión de los ligandos con el receptor. Como resultado de este procedimiento, en la Figura 18, todos los cannabinoides estudiados se unen en el dominio extracelular y la región de acoplamiento del nAChR $\alpha 7$, lo cual tuvo gran relevancia debido a que todos los ligandos compartían la misma área de interacción celular, que consiste en las láminas β plegadas antiparalelas internas ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 5$, $\beta 6$ y $\beta 8$) y externas ($\beta 4$, $\beta 7$, $\beta 9$ y $\beta 10$). Se destaca la zona que conecta las láminas $\beta 6$ y $\beta 7$, donde se encuentra el enlace disulfuro formado por dos cisteínas adyacentes, una característica distintiva de la superfamilia de receptores Cys-Loop (Albuquerque *et al.*, 2009).

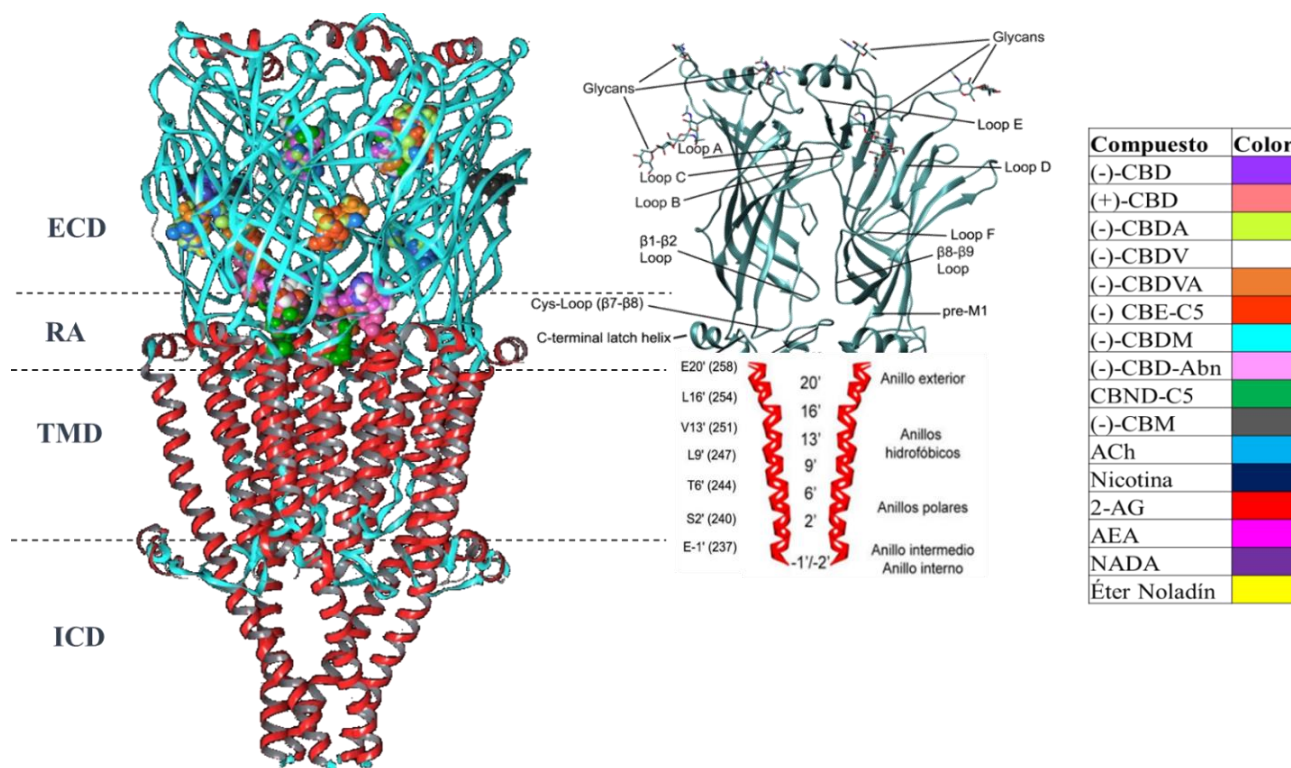


Figura 17. Posibles sitios de interacción de los ligandos cannabinoides en el nAChR $\alpha 7$. Se muestra la descripción topológica del nAChR $\alpha 7$, el dominio extracelular está conformado por una hélice α corta en el extremo N-terminal, seguido de 10 láminas β plegadas en conformación β -sándwich. Existen loops que conectan las diferentes estructuras proteicas enumeradas del 1 (hélice α a $\beta 1$) al 10 ($\beta 9$ a $\beta 10$). Se puede notar que los ligandos cannabinoides se unen principalmente en el dominio extracelular (ECD) y en la región de acoplamiento (RA) del nAChR $\alpha 7$. Los sitios de

unión fueron determinados por el *blind docking*, además se muestra el nombre y el color de los ligandos para este estudio.

Según se muestra en las Figuras 18 y 19, a cada cannabinoide se le asignó un color específico para distinguir su estructura química dentro del receptor. Es relevante destacar que no todos los cannabinoides se unían en los mismos sitios de unión debido a que se localizaban en distintas partes del receptor. Como se muestra en la Figura 19 los posibles sitios totales de unión para el Cannabidiol y sus análogos era de 40 sitios de unión, sin embargo, esto no podría ser posible en la realidad.

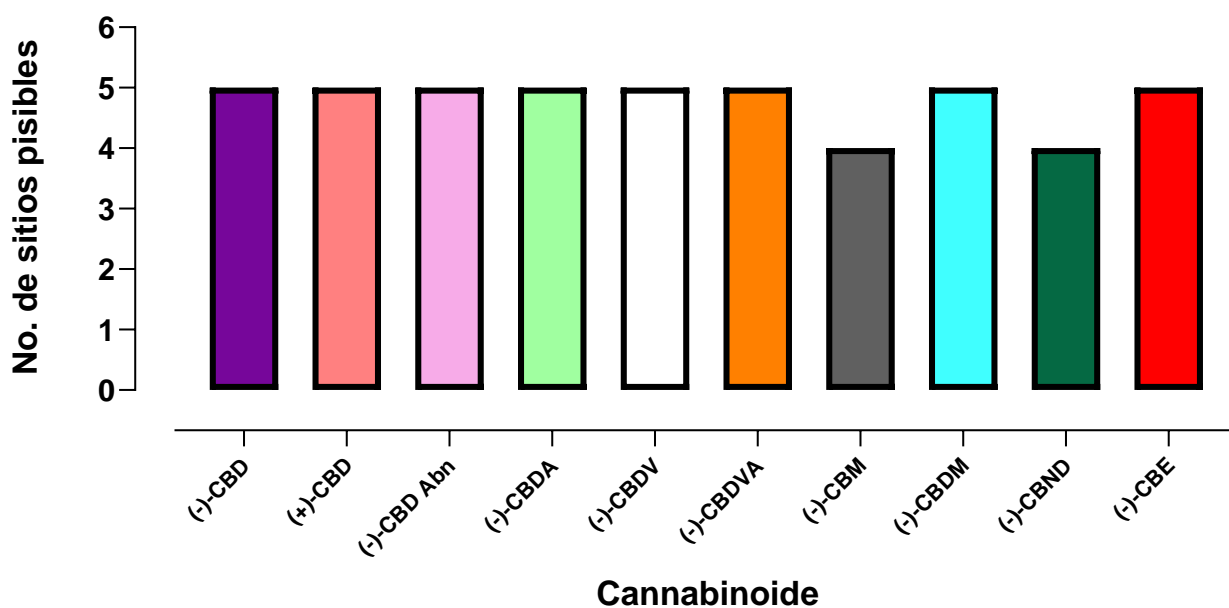


Figura 18. Número de sitios posibles para cada ligando en el dominio extracelular del nAChR $\alpha 7$. Se muestra el histograma y los sitios de unión para los fitocannabinoides en el *blind docking*.

Basándose en el histograma de la Figura 19, se realizó una *rendering docking* para detectar los sitios de relevancia fisicoquímica, donde el puntaje de acoplamiento sirve como un indicador de la interacción a nivel atómico que pronostica la fuerza y estabilidad de unión entre los compuestos cannabinoides y el receptor nAChR $\alpha 7$. Entre más negativo es el valor, mayor es la afinidad del ligando por el sitio.

De manera que se obtuvo 12 sitios con los datos más relevantes de unión. De los 12 sitios totales, se reportó que 6 sitios eran distales al poro iónico y 6 cercanos al poro.

Con el fin de mantenerse dentro del parámetro de los objetivos de esta investigación, se examinarán únicamente tres de los doce sitios totales. El motivo de esto fue que el ligando (-)-CBD aparece únicamente en estos tres sitios, sitios que están ubicados cerca del poro iónico en el dominio extracelular del nAChR $\alpha 7$.

A continuación, se detalla los tres sitios de unión.

10.1.1 Sitio de unión 1 sin membrana

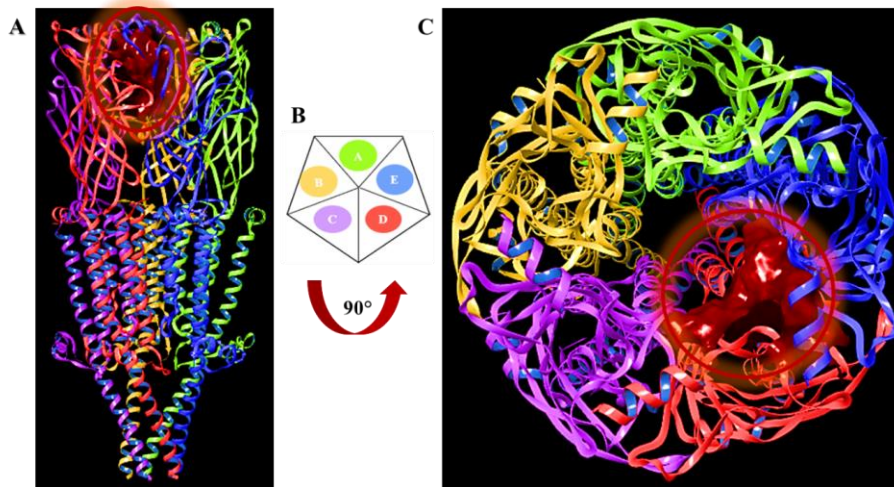


Figura 19. Sitio de unión 1 sin membrana celular. Se presenta el primer sitio de unión y la estructura proteica del nAChR $\alpha 7$. A) Se muestra una vista lateral del sitio de unión 1, donde la cavidad se destaca en color rojo y está ubicada principalmente en el dominio extracelular. B) Se utiliza una nomenclatura de colores para cada una de las subunidades α que forman el pentámero proteico. C) Se muestra una vista superior del sitio 1, evidenciando que la cavidad se encuentra en la interfaz de dos subunidades $\alpha 7$ (D y E).

Como se mencionó anteriormente, el primer sitio que fue representativo para el ligando (-)-CBD y sus análogos se muestra en la figura 20, es el sitio de unión 1. Se observa que el sitio de unión se encuentra en la zona estructural de las láminas β plegadas internas de la porción extracelular de las dos subunidades $\alpha 7$ (D y E), además este sitio tiene contacto con el poro iónico del receptor. Esta región está constituida por una serie de loops que median la conexión funcional entre las distintas estructuras secundarias del ECD. Los loops aportados por el ECD incluyen el, loop 6 ($\beta 5$ - $\beta 6$), loop 7 ($\beta 6$ - $\beta 7$) y el loop 9 ($\beta 8$ - $\beta 9$).

Para poder saber cómo es que se estaban acoplando los ligandos al sitio de unión, se determinó el *docking score* como parámetro fisicoquímico de la energía necesaria para formar el complejo ligando-receptor.

El *docking score* es una medida de esta interacción, donde puntajes más negativos indican una unión más fuerte y potencialmente más efectiva entre la molécula y la proteína objetivo.

Valores de *Docking Score* de los ligandos del sitio de unión número 1

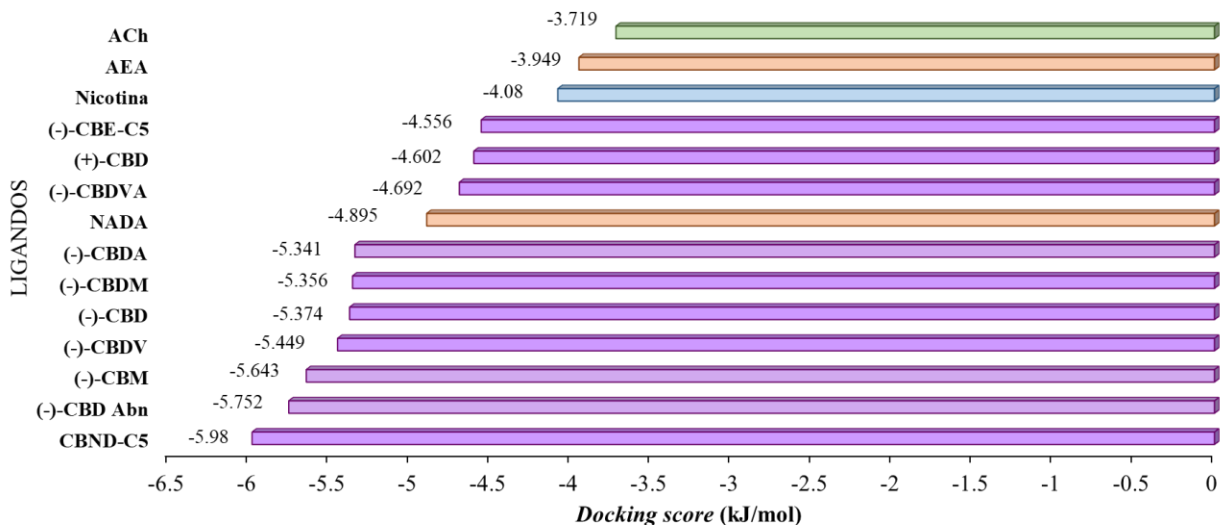


Figura 20. Valores de *Docking Score* para el sitio de unión 1 sin membrana. Se observa el valor del *docking score* de cada ligando que se encuentra en el sitio 1. Es importante notar que tanto el (-)-CBD como sus análogos muestran afinidad por el nAChR $\alpha 7$, resaltando que el CBND-C5 es el ligando más a fin.

En la Figura 21 se observa la variación de la energía de unión para cada ligando. Se destaca que, entre los endocannabinoides, solo la AEA y el NADA se unen al nAChR $\alpha 7$, lo cual representa un hallazgo significativo en la interacción, debido a que los endocannabinoides pueden modular la actividad de canales iónicos en este caso al nAChR $\alpha 7$. En cuanto a los fitocannabinoides, se encontró que las 10 estructuras propuestas muestran afinidad por el nAChR $\alpha 7$, siendo el CBND-C5 el más destacado al presentar el valor negativo más alto en energía de unión (-5.980 kJ/mol).

Basándose en la relación de la ecuación 1 con la ecuación 2 que vincula el puntaje del *docking score* como una representación de la energía de Gibbs para la espontaneidad de una reacción química, se calculó la constante de afinidad (Kd) para la unión entre los ligandos y el nAChR $\alpha 7$. De igual forma, la ecuación 2 puede ser relacionada con la ecuación 3 que define la eficiencia de unión de una interacción química (LE), la cual es una medida que relaciona el tamaño de una molécula con su energía de afinidad. De este modo, se recopiló esta información la Tabla 2.

$$Kd = \frac{[F - R]}{[F] + [R]} \quad \text{(ecuación 1)} \quad \rightarrow \quad \text{Docking Score} = -2.3RT \log\left(\frac{1}{Kd}\right) = 2.3RT \log(Kd) \quad \text{(ecuación 2)} \quad \rightarrow \quad LE = \frac{\text{Docking Score}}{n} \quad \text{(ecuación 3)}$$

La Tabla 2 muestra los principales parámetros evaluados en el carácter de afinidad ligando-receptor, se muestra que el (-)-CBD y el (-)-CBDM son moléculas intermediarias en la energía de interacción ligando-receptor.

Tabla 2. Docking Score y parámetros fisicoquímicos de afinidad para los diferentes ligandos del sitio 1.

SITIO DE UNIÓN NÚMERO 1			
Molécula	Docking Score (kJ/mol)	Kd [M] (calculado)	LE (kJ/mol*átomos distintos a H)
(-)-CBE-C5	-4.556	0.159	-0.190
(+)-CBD	-4.602	0.156	-0.200
(-)-CBDVA	-4.692	0.150	-0.196
(-)-CBDA	-5.341	0.116	-0.205
(-)-CBDM	-5.356	0.115	-0.223
(-)-CBD	-5.374	0.114	-0.234
(-)-CBDV	-5.449	0.111	-0.259
(-)-CBM	-5.643	0.102	-0.245
(-)-CBD Abn	-5.752	0.098	-0.250
CBND-C5	-5.980	0.089	-0.260

10.1.1.1 Naturaleza aminoacídica del sitio 1

En la figura 22 se muestra la nomenclatura utilizada para identificar la naturaleza de los residuos aminoacídicos como el tipo de interacción que ocurre entre el ligando y el receptor, esto es representativo para cada ligando del sitio 1.

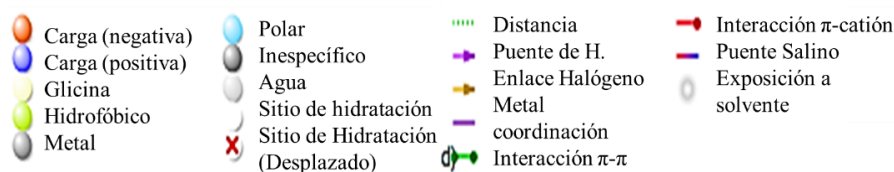


Figura 21. Nomenclatura de las diferentes interacciones moleculares que se forma en el sitio de un3n 1. Se muestra la naturaleza de cada residuo aminoacídico participe en el sitio de un3n y el tipo de interacci3n molecular que forma con cada ligando.

Se destaca que en la figura 23, el ligando con mayor afinidad energ3tica (CBND-C5) establece puentes de hidr3geno con los grupos hidroxilo de los residuos aminoacídicos Asp 104 y Lys 109

de la subunidad $\alpha 7$ D del nAChR $\alpha 7$. Además, el anillo aromático que carece de grupos hidroxilo forma interacciones π - π con el residuo His 127 de la misma subunidad $\alpha 7$. La unión del complejo se caracteriza principalmente por ser hidrofóbica, debido a la presencia mayoritaria de residuos apolares que participan en la interacción entre el ligando y el receptor.

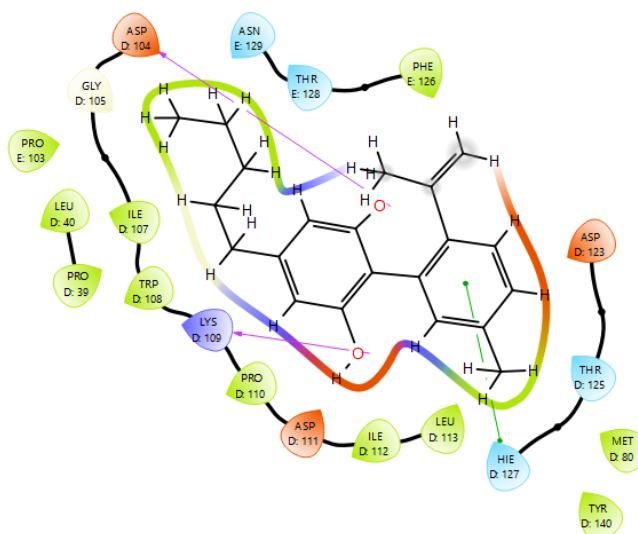


Figura 22. Representación 2D del tipo de interacción molecular formada en el sitio de unión 1 correspondiente al ligando CBND-C5.

En el caso del (-)-CBD Abn, Figura 24, el ligando crea 2 puentes de hidrógeno entre los 2 grupos hidroxilo con los residuos aminoacídicos Pro 110 y Asp 123 de la subunidad $\alpha 7$ D. El complejo presenta varios residuos aminoacídicos de naturaleza iónica. Para la (-)-CBM, todos los grupos hidroxilos de esta molécula formaron puentes de hidrógeno con los residuos Asp 104, Ile 107 y Lys 109 de la subunidad $\alpha 7$ D. El complejo de unión es variado y es el único ligando que presenta 2 puentes de hidrógeno en el mismo residuo aminoacídico Lys 109.

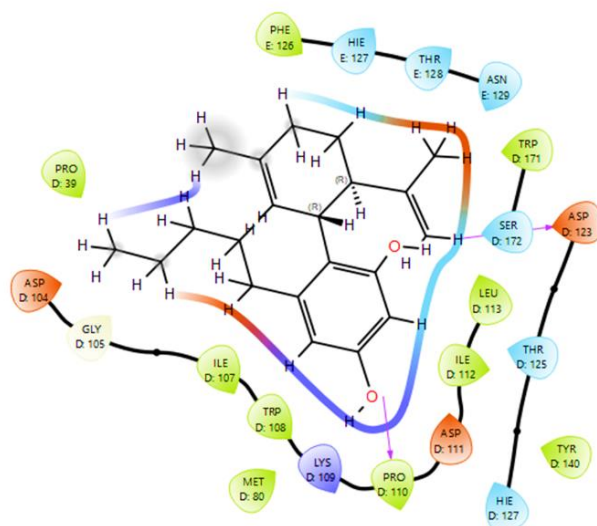


Figura 23 Representación 2D del tipo de interacción molecular formada en el sitio de unión 1 correspondiente al ligando (-)-CBD Abn.

Como se muestra en la Figura 25 y 26, la (-)-CBDV y el (-)-CBD forman 2 puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilos de cada ligando y los residuos aminoacídicos Lys 109 y Asp 104 de la subunidad $\alpha 7$ D. De igual forma, estas moléculas presentaron una interacción del tipo π -catión con el residuo Lys 109. La única diferencia que existe entre estos dos ligandos es la presencia del residuo aminoacídico Tyr 273, Pro 39 y Leu 40 de la subunidad $\alpha 7$ D.

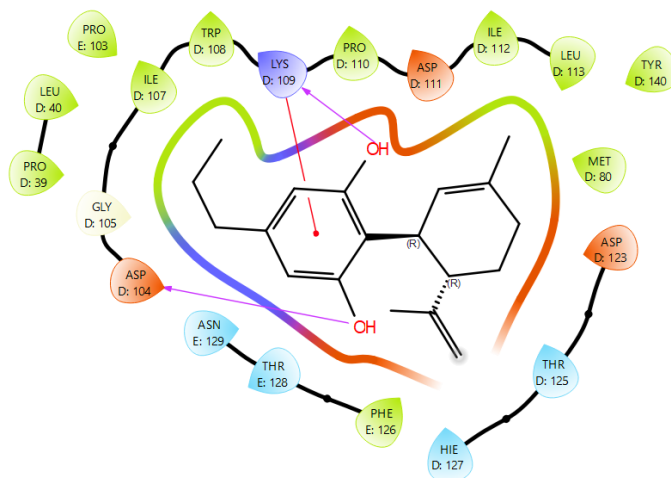


Figura 24. Representación 2D del tipo de interacción molecular formada en el sitio de unión 1 correspondiente al ligando (-)-CBDV.

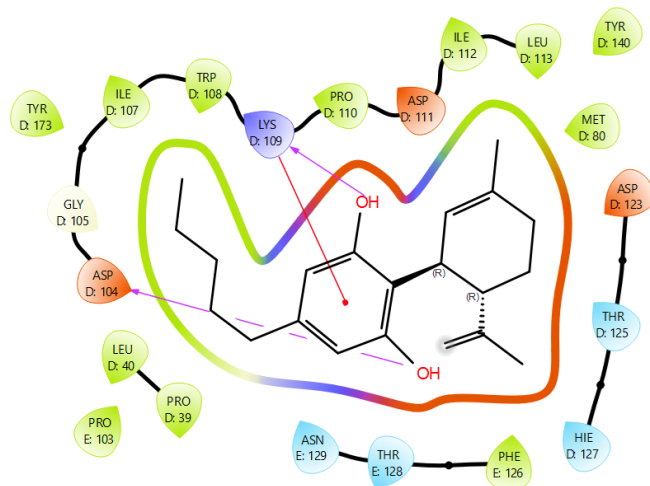


Figura 25. Representación 2D del tipo de interacción molecular formada en el sitio de unión 1 correspondiente al ligando (-)-CBD.

El (-)-CBDM, Figura 27, presenta una interacción π -catión entre el anillo aromático del ligando y la Lys 109 de la subunidad $\alpha 7$ D, de igual forma, crea un puente de hidrógeno con un grupo hidroxilo y el mismo aminoácido. El sitio de unión formado por este ligando y el nAChR $\alpha 7$, presenta una considerable cantidad de residuos hidrofóbicos que sirven para la estabilización del complejo ligando-receptor.

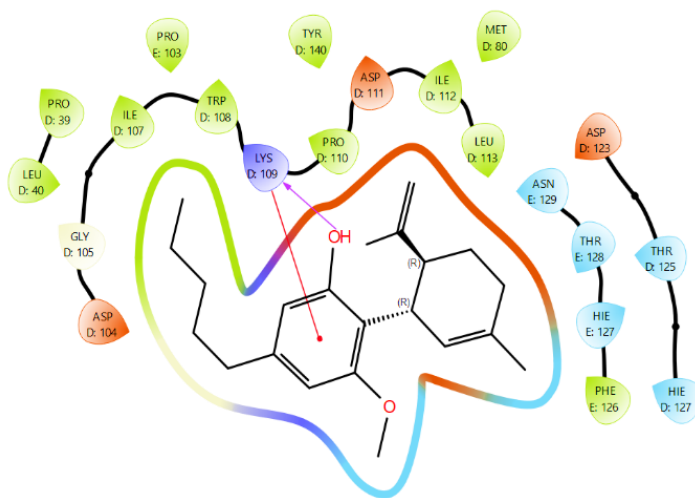


Figura 26. Representación 2D del tipo de interacción molecular formada en el sitio de unión 1 correspondiente al ligando (-)-CBDM.

Los análogos ácidos como el (-)-CBDA y el (-)-CBDVA, Figura 28 y 29 correspondientemente, establecen puentes de hidrógeno con un único grupo hidroxilo, interactuando con los aminoácidos Asp 104 y Lys 109 de la subunidad $\alpha 7$ D. Sin embargo, el (-)-CBDA forma además dos puentes

de hidrógeno entre el grupo carbonilo y el grupo hidroxilo libre, enlazándose con los residuos aminoacídicos Asn 129 de la subunidad $\alpha 7$ E y His 127 de la subunidad $\alpha 7$ D. Una interacción relevante del (-)-CBDA implica la creación de un puente salino entre el grupo hidroxilo del ácido carboxílico y la Lys 109. Por otro lado, el (-)-CBDVA establece un puente de hidrógeno con el aminoácido Lys 109.

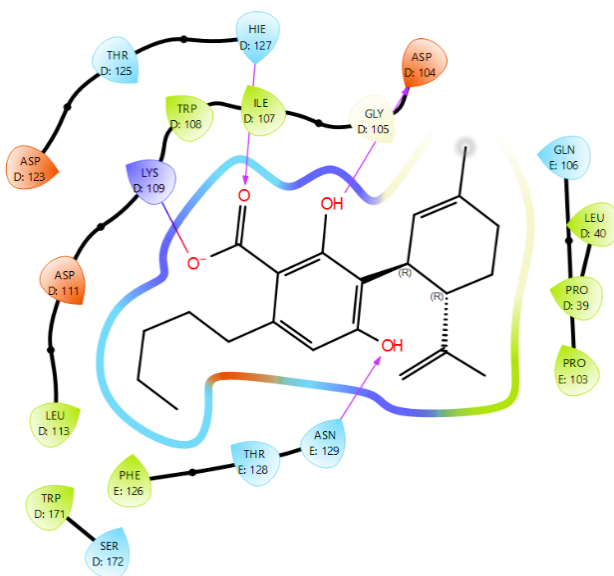


Figura 27. Representación 2D del tipo de interacción molecular formada en el sitio de unión 1 correspondiente al ligando (-)-CBDA.

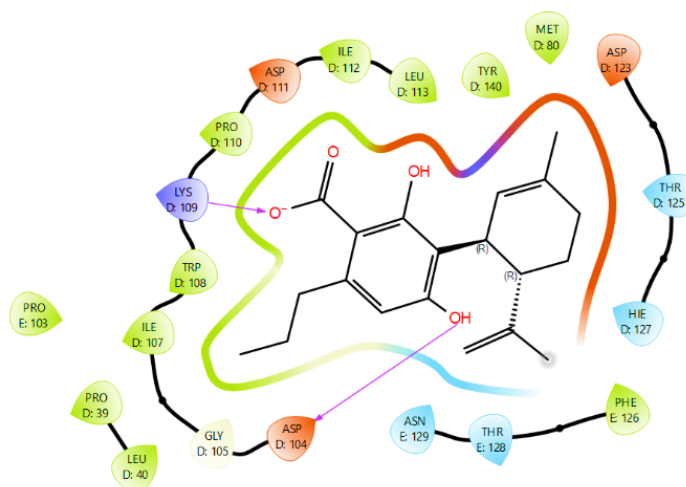


Figura 28. Representación 2D del tipo de interacción molecular formada en el sitio de unión 1 correspondiente al ligando (-)-CBDVA.

Como se ilustra en la Figura 30, el diastereoisómero (+)-CBD, no se observó ninguna interacción molecular significativa. Sin embargo, se identificó la presencia de varios residuos aminoacídicos

hidrofóbicos como Tyr, Pro, Leu, Trp y Ile. Estos residuos fueron otorgados por las dos caras interfaciales de cada subunidad $\alpha 7$ que conforma el sitio de unión. Los aminoácidos contribuyen en la estabilización del complejo ligando-receptor por medio de interacciones hidrofóbicas.

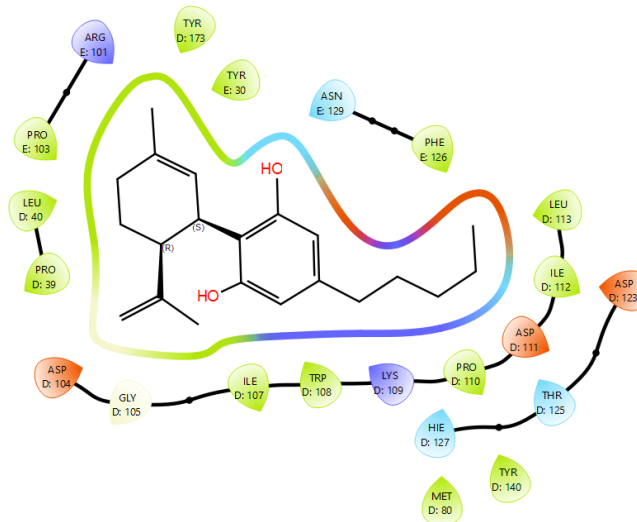


Figura 29. Representación 2D del tipo de interacción molecular formada en el sitio de unión 1 correspondiente al ligando (+)-CBD.

En el caso del ligando (-)-CBE-C5, Figura 31, se muestra la formación de un puente de hidrógeno con el Asp 123 y el grupo hidroxilo cercano al tetrahidrofurano en la molécula, necesario para el reconocimiento celular del sitio de unión. También se observó la presencia de aminoácidos hidrofóbicos como Ile, Trp, Tyr, Leu, Met, entre otros que ayudan a estabilizar la interacción ligando-receptor.

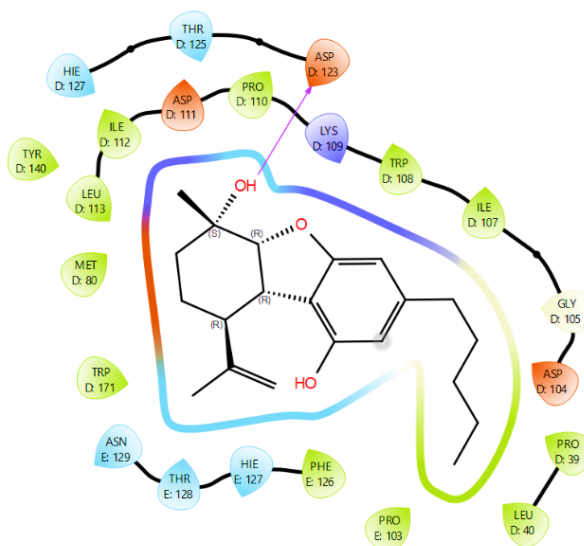


Figura 30. Representación 2D del tipo de interacción molecular formada en el sitio de unión 1 correspondiente al ligando (-)-CBE-C5.

La Figura 32, muestra el ligando (-)-CBM con 4 enlaces de hidrógeno, consecuencia de la interacción de los grupos hidroxilos presentes en el grupo resorcinol de la estructura química de la (-)-CBM, y además de la contribución de un solo grupo hidroxilo presente en el ciclopentano. Los residuos aminoacídicos participes en la formación de estas interacciones son LYS 109, ASP 104 y Ile 107 de la subunidad $\alpha 7$ D.

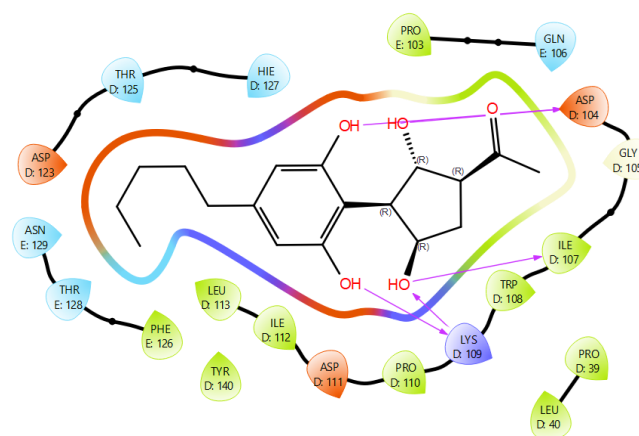


Figura 31. Representación 2D del tipo de interacción molecular formada en el sitio de unión 1 correspondiente al ligando (-)-CBM.

Algo importante de mencionar es que el residuo aminoacídico Gly 105 de la subunidad $\alpha 7$ D, está presente en todos los sitios de interacción molecular, se puede resaltar la participación de este residuo como elemento necesario para el alojamiento de todos los ligandos análogos del (-)-CBD.

10.1.2 Sitio de unión 2 sin membrana.

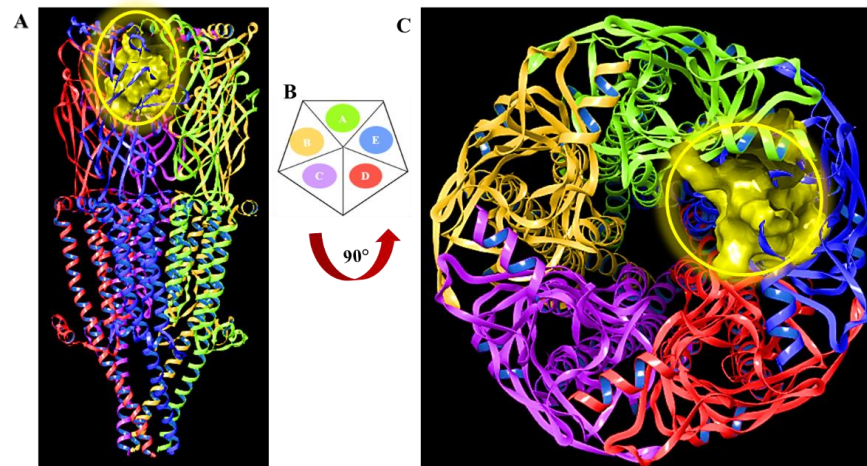


Figura 32. Sitio de unión 2 sin membrana celular. Se presenta el segundo sitio de unión y la estructura proteica del nAChR $\alpha 7$. A) Se muestra una vista lateral del sitio de unión 2, donde la cavidad se destaca en color amarillo y está ubicada principalmente en el dominio extracelular. B) Se utiliza una nomenclatura de colores para cada una de las subunidades α que forman el pentámero proteico. C) Se muestra una vista superior del sitio 2, evidenciando que la cavidad se encuentra en la interfaz de dos subunidades $\alpha 7$ (E y A).

Siguiendo la metodología, el siguiente sitio donde se encontraba el (-)-CBD y sus análogos se muestra en la Figura 33. El sitio de unión 2 se encuentra principalmente en el ECD y cercano al poro iónico, el sitio está formado por la interfaz de dos subunidades $\alpha 7$ (E y A). Esta región está constituida por una serie de loops aportados por el ECD de cada subunidad $\alpha 7$, incluye el loop 2 ($\beta 1$ - $\beta 2$), el loop 3 ($\beta 3$ - $\beta 5$) y parte de la lámina $\beta 6$.

Según se observa en la Figura 34, los endocannabinoides continúan interactuando con el receptor. Asimismo, tanto el (-)-CBD como todos sus análogos muestran afinidad por el nAChR $\alpha 7$, resaltando especialmente la interacción del CBND-C5 con el valor más negativo de energía de unión. Tras obtener los valores de *docking score*, se calcularon los Kd y LE para cada ligando, toda esta información se recopila en la Tabla 3.

Valores de *Docking Score* de los ligandos del sitio de unión número 2

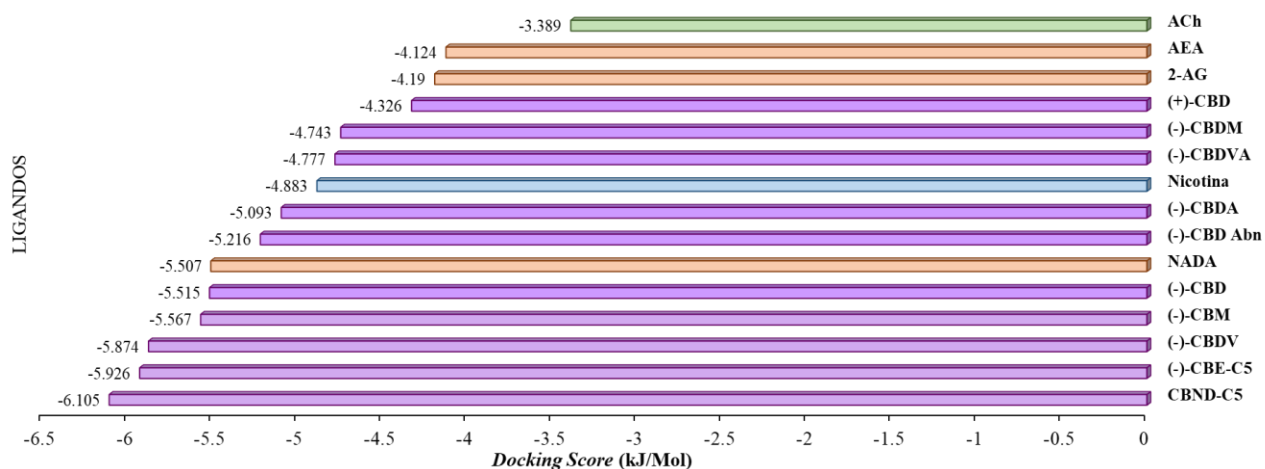


Figura 33. Valores de *Docking Score* para el sitio de unión 2 sin membrana. Se observa el valor del *docking score* de cada ligando que se encuentra en el sitio 2. Es importante notar que tanto el (-)-CBD como sus análogos muestran afinidad por el nAChR $\alpha 7$, resaltando que el CBND-C5 es el ligando más a fin.

Como se indica en la Tabla 3, tanto el (-)-CBD como el (-)-CBD Abn se sitúan en la mediana aritmética de los resultados fisicoquímicos de todos los ligandos. Asimismo, en la tabla 2 se observan valores negativos de *docking score* para cada ligando, lo que influye en la formación de productos en el equilibrio. Un valor negativo de *docking score* implica una K_d positiva, lo que señala que los productos se ven favorecidos a medida que avanza la reacción hacia el equilibrio, es decir, la formación del complejo ligando-receptor se ve beneficiado.

Tabla 3. *Docking score* y parámetros fisicoquímicos de afinidad para los diferentes ligandos del sitio 2.

SITIO DE UNIÓN NÚMERO 2			
Molécula	<i>Docking Score</i> (kJ/mol)	K_d [M] (calculado)	LE (kJ/mol*átomos distintos a H)
CBND-C5	-6.105	0.085	-0.265
(-)-CBE-C5	-5.926	0.091	-0.247
(-)-CBDV	-5.874	0.093	-0.280
(-)-CBM	-5.567	0.106	-0.242
(-)-CBD	-5.515	0.108	-0.240
(-)-CBD Abn	-5.507	0.108	-0.239
(-)-CBDA	-5.216	0.122	-0.201
(-)-CBDVA	-5.093	0.128	-0.212
(-)-CBDM	-4.883	0.139	-0.203
(+)-CBD	-4.777	0.145	-0.208

10.1.2.1 Naturaleza aminoacídica sitio 2.

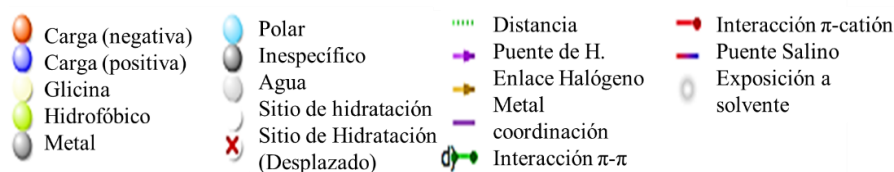


Figura 34. Nomenclatura de las diferentes interacciones moleculares que se forma en el sitio de unión 2. Se muestra la naturaleza de cada residuo aminoacídico que participa en el sitio de unión y el tipo de interacción molecular que forma con cada ligando.

Como se puede apreciar en la Figura 35, las interacciones moleculares cambian según el tipo de ligando y del aminoácido que interacciona por parte del nAChR $\alpha 7$. Por lo tanto, en la Figura 36, el CBND-C5 forma dos puentes de hidrógeno con los 2 grupos hidroxilo de la molécula y los residuos aminoacídicos Asp 104 y Lys 109 de la subunidad $\alpha 7$ E. En contraste, el anillo aromático sin grupos hidroxilo establece interacciones π - π con el residuo His 127 de la misma subunidad. Este sitio de unión está mayoritariamente compuesto por aminoácidos hidrofóbicos.

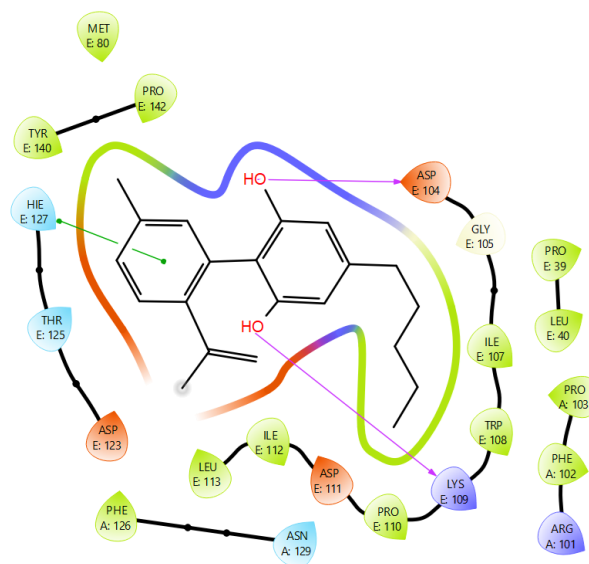


Figura 35. Representación 2D del tipo de interacción molecular formada en el sitio de unión 2 correspondiente al ligando CBND.

Para la (-)-CBE-C5, Figura 37, se muestran 2 puentes de hidrógeno formados por un grupo hidroxilo del anillo aromático del ligando y el residuo aminoacídico Asp 104 de la subunidad $\alpha 7$ E. De igual forma el grupo hidroxilo que se encuentra cerca del anillo del tetrahydrofurano forma el puente con el residuo Asn 129 de la subunidad A. Ligandos presentan un mayor porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos.

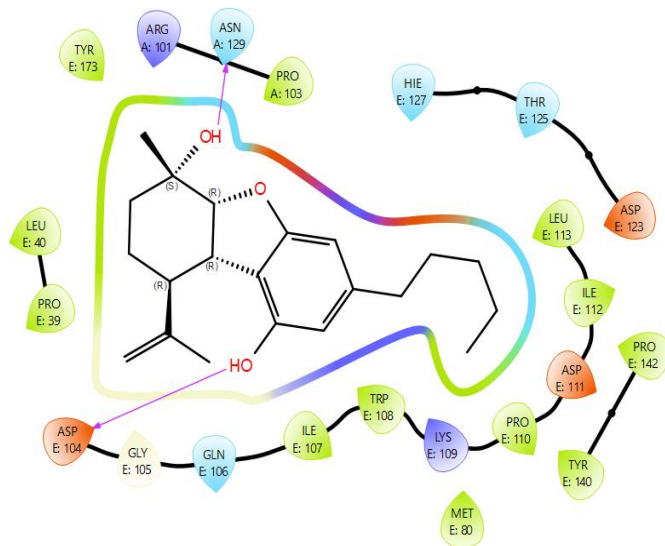


Figura 36. Representación 2D del tipo de interacción molecular formada en el sitio de unión 2 correspondiente al ligando (-)-CBE-C5.

En la Figura 38, la (-)-CBDV crea dos puentes de hidrógeno entre los residuos aminoácidos Asp 104 y Lys 109 de la subunidad E y los grupos hidroxilos presentes en el ligando. Al analizar la (-)-CBM se encontró la formación de 2 puentes de hidrógeno entre el Asp 104 y la Ile 107 de la subunidad $\alpha 7$ E. En ambos ligandos se encuentran aminoácidos hidrofóbicos que pudieran tener alguna interacción importante para la estabilidad del complejo.

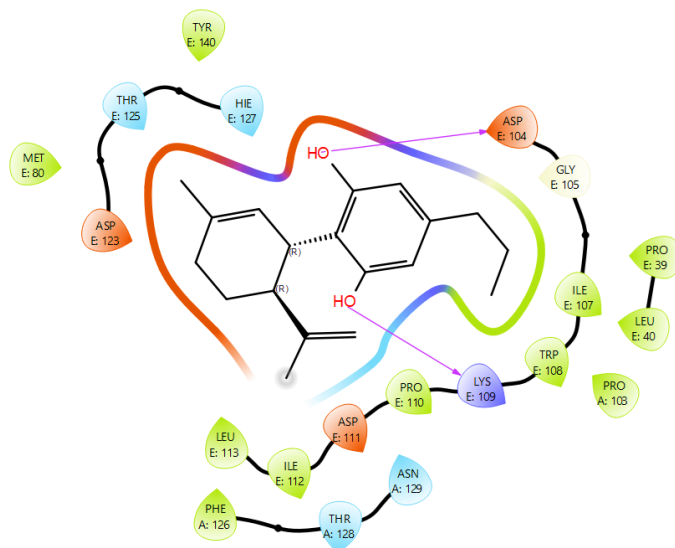


Figura 37. Representación 2D del tipo de interacción molecular formada en el sitio de unión 2 correspondiente al ligando (-)-CBDV.

Para las moléculas intermediarias con respecto a los valores del *docking score*. El (-)-CBD y su análogo el (-)-CBD Abn, Figuras 39 y 40 respectivamente, ambos ligandos presentan un puente de hidrógeno entre el Asp 104 de la subunidad α 7 E y un grupo hidroxilo del anillo aromático de ambos compuestos. La única diferencia es que el otro grupo hidroxilo forma en el caso del (-)-CBD un puente de hidrógeno con la Lys 109 de la subunidad E, y con el (-)-CBD Abn crea una interacción π -catión con el mismo aminoácido (Lys 109).

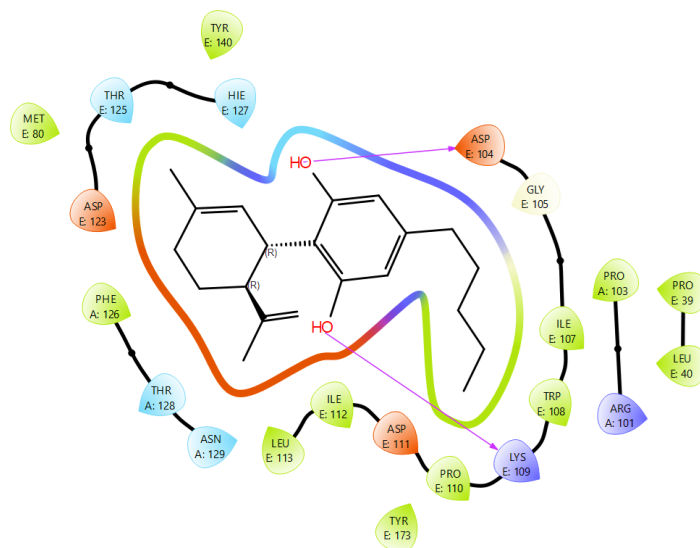


Figura 38. Representación 2D del tipo de interacción molecular formada en el sitio de unión 2 correspondiente al ligando (-)-CBD.

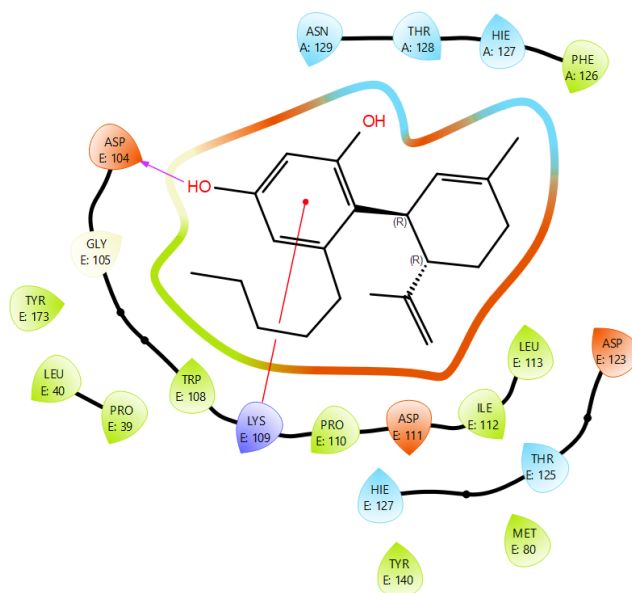


Figura 39. Representación 2D del tipo de interacción molecular formada en el sitio de unión 2 correspondiente al ligando (-)-CBD Abn.

Como se puede ver en la Figura 41 y 42, los análogos ácidos (-)-CBDA y (-)-CBDVA establecen puentes de hidrógeno con un solo grupo hidroxilo y el residuo de aminoácido LYS 109 de la subunidad E. En el caso del (-)-CBDA, se forma otro puente de hidrógeno con el Asp 104 con el hidroxilo libre.

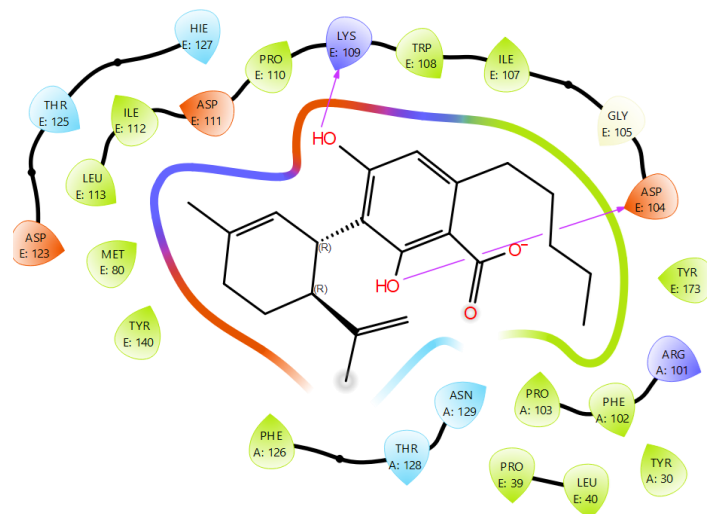


Figura 40. Representación 2D del tipo de interacción molecular formada en el sitio de unión 2 correspondiente al ligando (-)-CBDA.

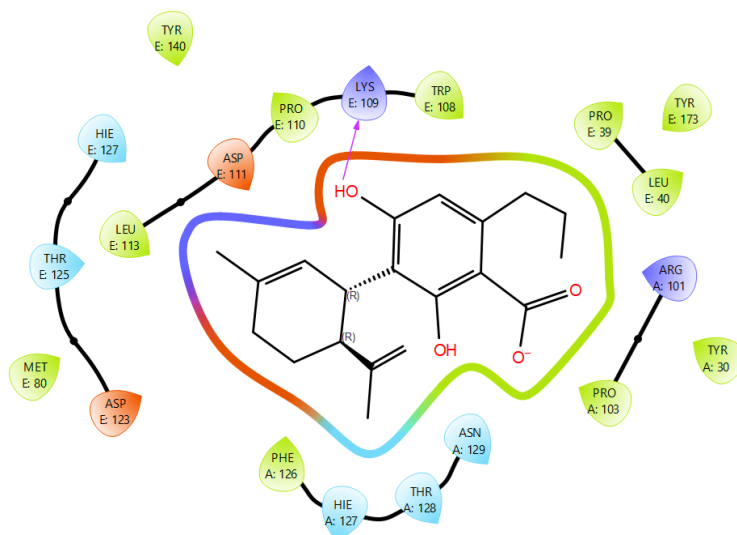


Figura 41. Representación 2D del tipo de interacción molecular formada en el sitio de unión 2 correspondiente al ligando (-)-CBDV.

En la Figura 43, el ligando (-)-CBDM forma un puente de hidrógeno con la Lys 109 de la subunidad E y el único grupo hidroxilo, de igual forma se crea una interacción de naturaleza π -cación con el mismo residuo aminoacídico.

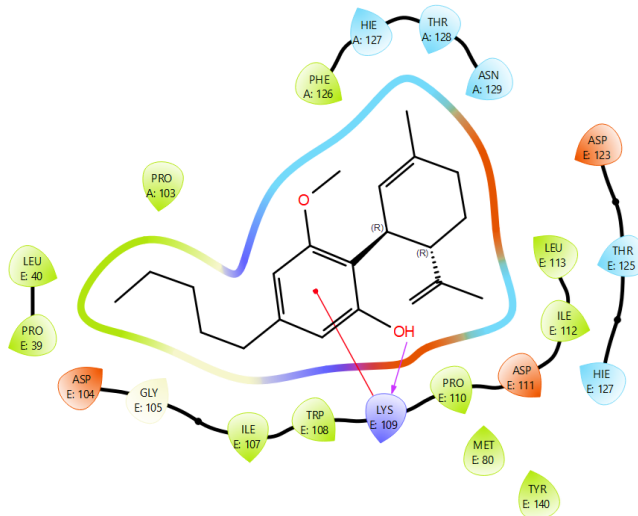


Figura 42. Representación 2D del tipo de interacción molecular formada en el sitio de unión 2 correspondiente al ligando (-)-CBDM.

El diastereoisómero (+)-CBD, Figura 44, muestra un puente de hidrógeno entre el residuo aminoacídico Asp 104 de la subunidad E, siendo la primera vez que crea un tipo de interacción molecular en el nACh $\alpha 7$.

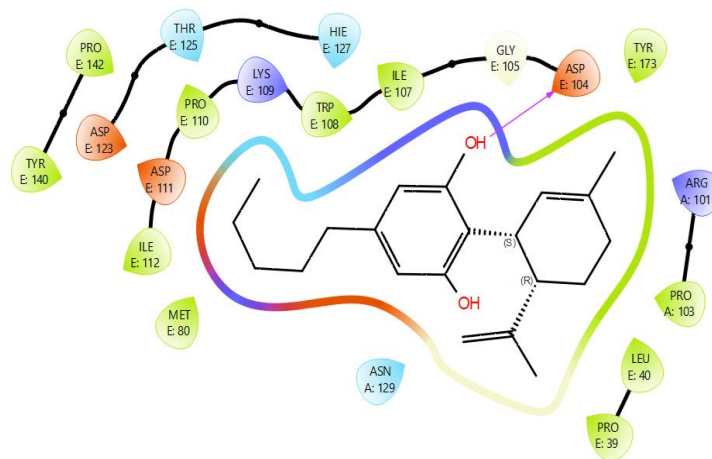


Figura 43. Representación 2D del tipo de interacción molecular formada en el sitio de unión 1 correspondiente al ligando (+)-CBD.

En el caso de la Figura 45, se muestra al ligando (-)-CBM formando 2 puentes de hidrógeno derivados de la interacción de dos grupos hidroxilos presentes en el anillo aromático y otro en el ciclpentano, estos grupos funcionales interacción con los residuos aminoacídicos ASP 104 y Leu 107 de la subunidad $\alpha 7$ E.

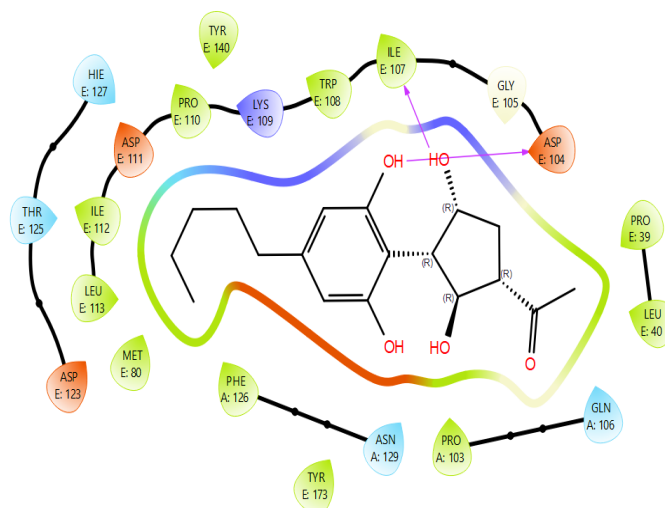


Figura 44. Representación 2D del tipo de interacción molecular formada en el sitio de unión 2 correspondiente al ligando (-)-CBM.

De igual forma que en el sitio 1, el residuo aminoacídico Gly 105 de la subunidad $\alpha 7$ E pero esta vez la subunidad E del pentámero fue la que participo principalmente en la interacción molecular con todos los análogos del (-)-CBD y el mismo Cannabidiol.

10.1.3 Sitio de unión 3 sin membrana.

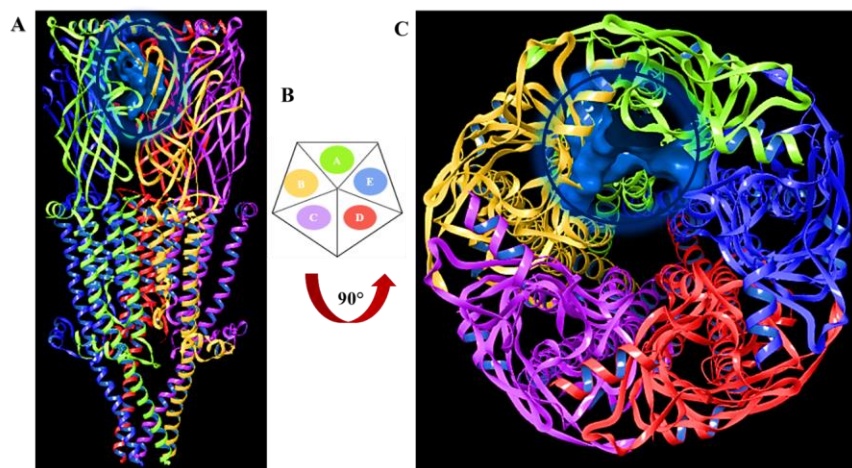


Figura 45. Sitio de unión 3 sin membrana celular. Se presenta el tercer sitio de unión y la estructura proteica del nAChR $\alpha 7$. A) Se muestra una vista lateral del sitio de unión 3, donde la cavidad se destaca en color azul y está ubicada principalmente en el dominio extracelular. B) Se utiliza una nomenclatura de colores para cada una de las subunidades α que forman el pentámero proteico. C) Se muestra una vista superior del sitio 3, evidenciando que la cavidad se encuentra en la interfaz de dos subunidades $\alpha 7$ (A y B).

Según se muestra en la Figura 46, al analizar el sitio de unión 3, se identificó que se forma en la interfaz de las subunidades $\alpha 7$ (A y B) entre los dominios extracelulares de ambas subunidades. Los bucles principalmente aportados por el dominio extracelular incluyen el loop 1 (hélice α - $\beta 1$), loop 2 ($\beta 1$ - $\beta 2$), bucle 3 ($\beta 2$ - $\beta 3$) y el loop 6 ($\beta 5$ - $\beta 6$). Además, se observa que este sitio establece contacto con el canal iónico del nAChR $\alpha 7$.

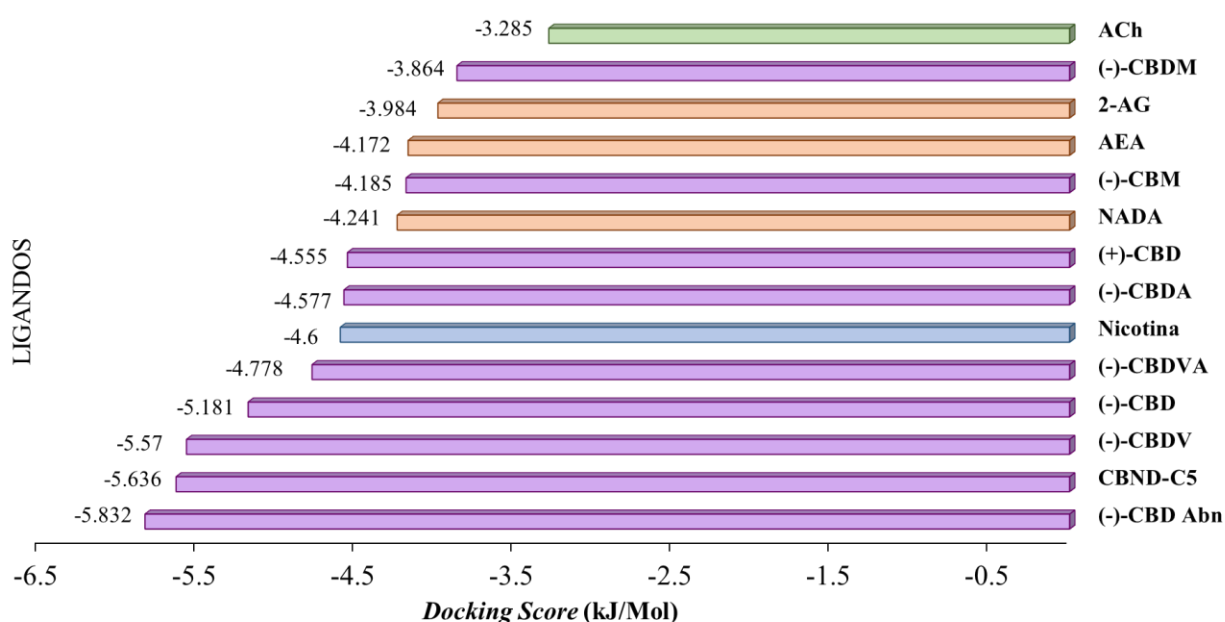


Figura 46. Valores de *Docking Score* para el sitio de unión 2 sin membrana. Se observa el *docking score* de cada ligando que se encuentra en el sitio 3. Es importante notar que tanto el (-)-CBD como 9 de sus análogos presentados en este trabajo muestran afinidad por el nAChR $\alpha 7$. Destacando el compuesto (-)-CBD Abn como el ligando con mayor afinidad hacia el nAChR $\alpha 7$.

Al analizar la Figura 47, se observa que los endocannabinoides continúan mostrando actividad química en la interacción ligando-receptor. Sin embargo, solo 9 estructuras de la familia del (-)-CBD se unen en este sitio, excluyendo a la (-)-CBE-C5, lo cual resulta interesante al no interactuar todos los análogos del (-)-CBD en esta ocasión. Destaca que el ligando (-)-CBD Abn exhibe el valor más negativo de *docking score* seguido por el CBND-C5, lo cual es significativo dado que anteriormente el CBND-C5 siempre había sido el ligando con el valor negativo más alto. En el

caso del (-)-CBD, se observa que esta vez no se encuentra en la mediana aritmética de los valores de energía de afinidad.

Como en los anteriores casos, se debe analizar la relación que tiene el *docking score* con la constante de afinidad (Kd) y la eficiencia de enlace (LE) para cada ligando del sitio 3, de tal manera que toda esta información se recopiló en la Tabla 4.

Tabla 4. *Docking score* y parámetros fisicoquímicos de afinidad para los diferentes ligandos del sitio 3.

SITIO DE UNIÓN NÚMERO 3			
Molécula	<i>Docking Score</i> (kJ/mol)	Kd [M] (calculado)	LE (kJ/mol*átomos distintos a H)
(-)-CBD Abn	-5.832	0.095	-0.254
CBND-C5	-5.636	0.103	-0.245
(-)-CBDV	-5.57	0.105	-0.265
(-)-CBD	-5.181	0.123	-0.225
(-)-CBDVA	-4.778	0.145	-0.199
(-)-CBDA	-4.577	0.157	-0.176
(+)-CBD	-4.555	0.159	-0.198
(-)-CBM	-4.185	0.184	-0.182
(-)-CBDM	-3.864	0.210	-0.161

De acuerdo con los datos de la Tabla 4, el ligando (-)-CBDVA representa la mediana aritmética del conjunto de datos, teniendo. La relación que existe en los resultados de la LE son características importantes de la funcionalización de los ligandos del (-)-CBD. Es decir, que la LE es proporcional al tamaño de la molécula. Sin embargo, hay datos que no presenta la relación de LE con su tamaño, como es el caso de los ligandos ácidos, siendo la interacción molecular un recurso importante para poder explicar dichos valores atípicos.

El objetivo de un programa de descubrimiento de medicamentos es, generalmente, encontrar una molécula que se una a la proteína deseada, a bajas concentraciones. Cuando un medicamento tiene el valor de la constante de disociación (Kd) muy pequeño, indica que éste y su objetivo biológico se unen fuertemente.

10.1.3.1 Naturaleza aminoacídica del sitio 3.

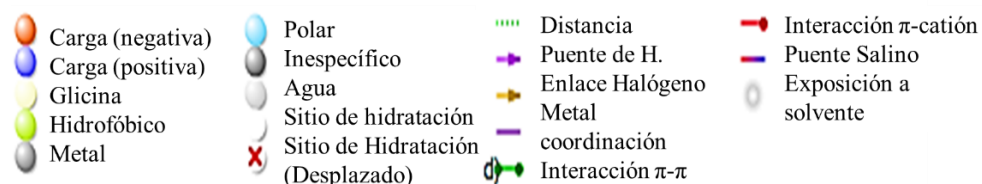


Figura 47. Nomenclatura de las diferentes interacciones moleculares que se forma en el sitio de unión 3. Se muestra la naturaleza de cada residuo aminoacídico que participa en el sitio de unión y el tipo de interacción molecular que forma con cada ligando.

Al examinar la Figura 48 y observar la Figura 49, el ligando (-)-CBD Abn, presenta, 2 puentes de hidrógeno entre los residuos aminoacídicos Asp 123 y Pro 110 de la subunidad $\alpha 7$ A y los 2 grupos hidroxilos del ligando, los aminoácidos hidrofóbicos e iónicos predominan en la interacción ligando-receptor.

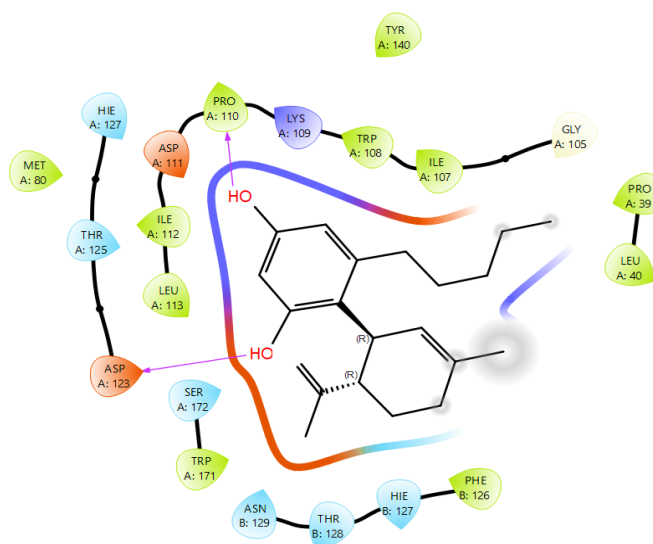


Figura 48. Representación 2D del tipo de interacción molecular formada en el sitio de unión 3 correspondiente al ligando (-)-CBD Abn.

Para el CBND-C5 en el sitio 3, Figura 50, presenta una interacción π - π con el residuo aminoacídico His 127 y el anillo aromático que no contiene los sustituyentes hidroxilo. También, en el sitio de unión hay 2 puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de la molécula y los residuos Lys 109 y Asp 104 de la subunidad $\alpha 7$ A.

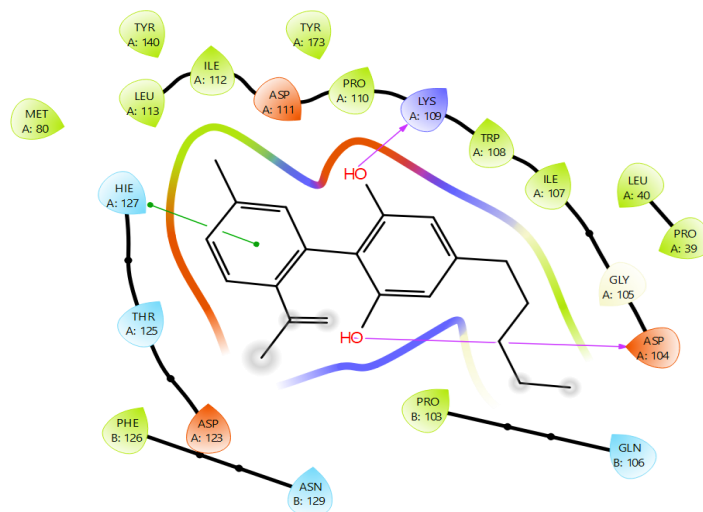


Figura 49. Representación 2D del tipo de interacción molecular formada en el sitio de unión 3 correspondiente al ligando CBND-C5.

Como se muestra en la Figura 51, el (-)-CBDV presenta dos puentes de hidrógeno entre los dos grupos hidroxilos de la molécula y los residuos Asp 104 y Lys 109 de la subunidad A, los aminoácidos hidrofóbicos predominan en el sitio de unión.

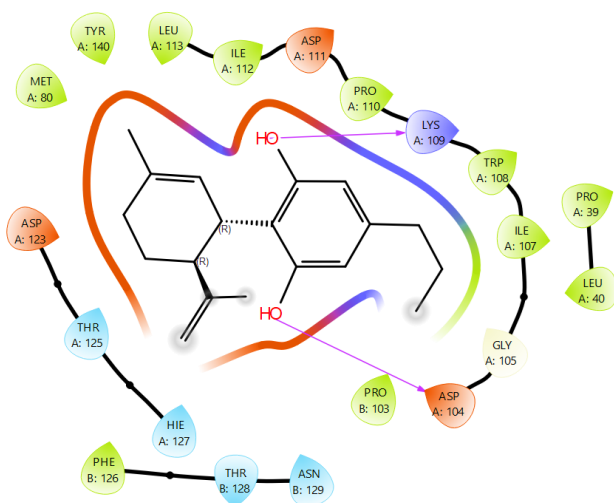


Figura 50. Representación 2D del tipo de interacción molecular formada en el sitio de unión 3 correspondiente al ligando (-)-CBDV.

El (-)-CBD, Figura 52, presenta los dos mismos puentes de hidrógeno que forma el (-)-CBDV con la peculiaridad de que existe una interacción π -catión con el anillo aromático del (-)-CBD y la Lys 109 de la subunidad $\alpha 7$ A.

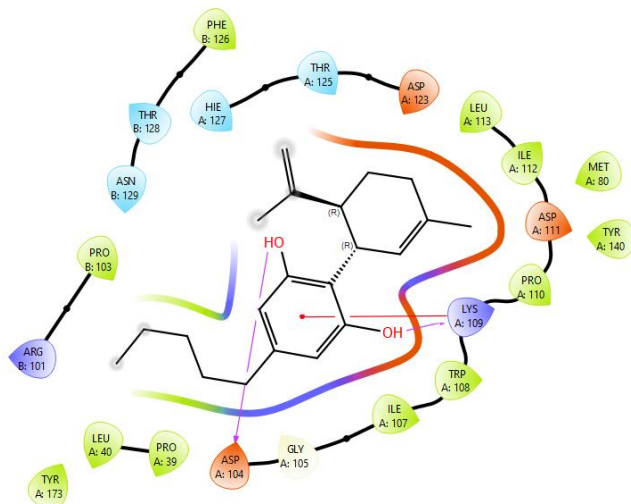


Figura 51. Representación 2D del tipo de interacción molecular formada en el sitio de unión 3 correspondiente al ligando (-)-CBD.

Los análogos ácidos (-)-CBDA y (-)-CBDVA, Figuras 53 y 54 respectivamente, ambos ligandos presentan dos puentes de hidrógeno, un puente se forma entre el Asn 129 de la subunidad $\alpha 7$ B y el carbonilo del ligando, el otro puente se crea entre el Asp 123 de la subunidad $\alpha 7$ A y un grupo hidroxilo de la molécula. La diferencia, es que el (-)-CBVA presenta otro puente de hidrógeno en el ácido carboxilo de este ligando.

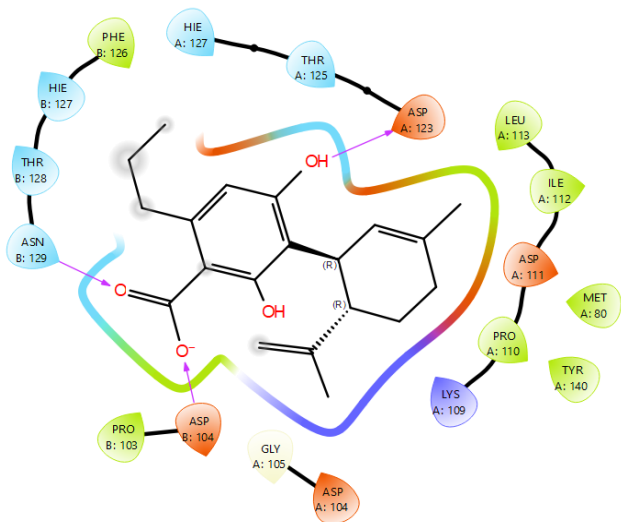


Figura 52. Representación 2D del tipo de interacción molecular formada en el sitio de unión 3 correspondiente al ligando (-)-CBDVA.

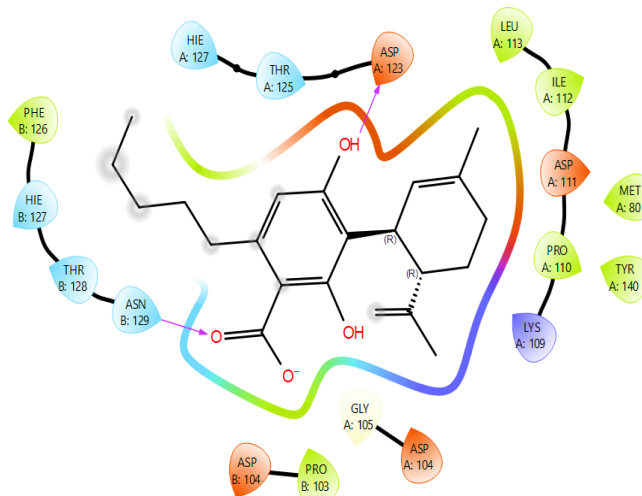


Figura 53. Representación 2D del tipo de interacción molecular formada en el sitio de unión 3 correspondiente al ligando (-)-CBD.

El (+)-CBD un puente de hidrógeno con el Asp 104 de la subunidad $\alpha 7$ A. Conserva una alta proporción de aminoácidos hidrófobos que estabilizan al ligando con el receptor.

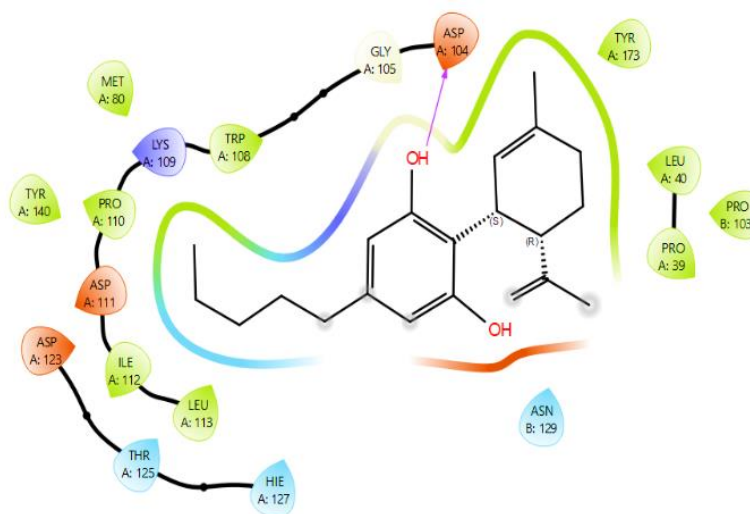


Figura 54. Representación 2D del tipo de interacción molecular formada en el sitio de unión 2 correspondiente al ligando (+)-CBD

Para el (-)-CBDM existe un puente de hidrógeno entre el único grupo hidroxilo y la Lys 109 de la subunidad $\alpha 7$ A, siendo los aminoácidos hidrofóbicos los que mayor participación tienen en la interacción molecular ligando-receptor.

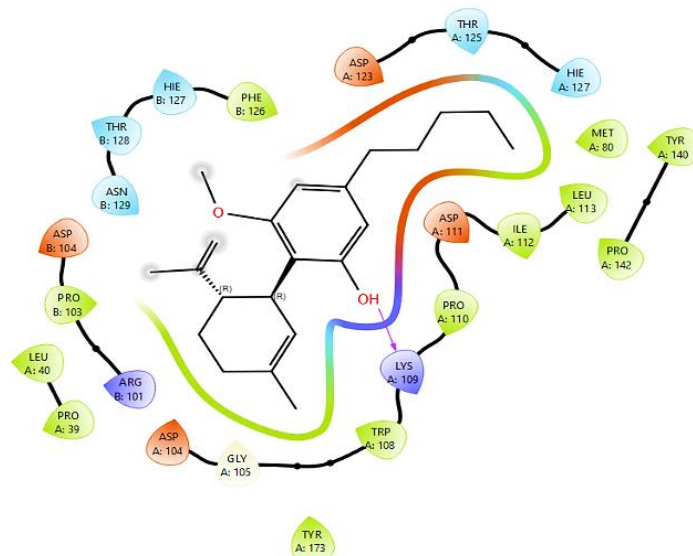


Figura 55. Representación 2D del tipo de interacción molecular formada en el sitio de unión 2 correspondiente al ligando (-)-CBDM.

Por último, la (-)-CBM es el ligando que presenta una variedad en el tipo de interacción molecular ligando-receptor. Un ejemplo de esto, son los tres puentes de hidrógeno que crea, de los cuales 2 son entre el Asp 123 y 104 de la subunidad $\alpha 7$ A y un grupo hidroxilo de la parte aromática y otro hidroxilo cerca del anillo de tetrahidrofurano de la (-)-CBM. El otro puente de hidrógeno se forma entre el grupo carbonilo del anillo del análogo del ciclopentano y el Asn 129 de la subunidad B. Otro ejemplo es la interacción π - π y π -catión que se da entre el anillo aromático del ligando y los residuos His 127 y Lys 109 respectivamente, de la subunidad $\alpha 7$ A. Los aminoácidos hidrofóbicos estabilizan al alcano de la (-)-CBM.

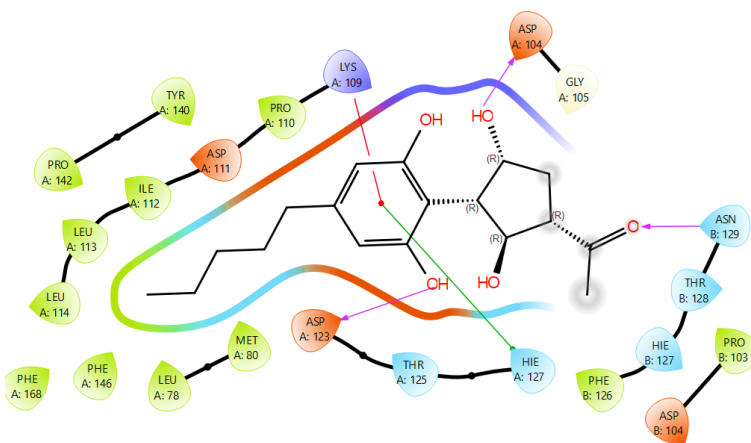


Figura 56. Representación 2D del tipo de interacción molecular formada en el sitio de unión 3 correspondiente al ligando (-)-CBM.

El residuo aminoacídico Gly 105 de la subunidad $\alpha 7$ A participo constantemente en la interacción molecular con 8 análogos del (-)-CBD y el mismo Cannabidiol. Recalcando la importancia que tiene este residuo en la composición de los tres sitios de interacción.

10.2 *Docking* molecular con membrana celular.

Hasta el momento no se ha dilucidado por completo el sitio de interacción del (-)-CBD en el nAChR $\alpha 7$, se ha reportado que pudiese ser a través de una vía de membrana, sin embargo, no hay ningún estudio que confirme algo al respecto (Chrestia *et al.*, 2022). Por tal motivo, se diseñó un *docking* molecular con membrana.

Se ha reportado por varios investigadores que el (-)-CBD, presenta múltiples efectos farmacológicos, siendo la molécula más estudiada hasta la fecha en experimentos tanto *in vivo* como *in vitro* (Oz. *et al.*, 2022). Fue así como se informó que este compuesto funciona principalmente como un modulador alostérico negativo del nAChR $\alpha 7$ y de otros receptores iónicos (Mahgoub *et al.*, 2013; Burstein 2015; Chrestia *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2020). Por ende, el *docking* con membrana se centró únicamente en los ligandos (-)-CBD y el diastereoisómero (+)-CBD, esto se hizo con la intención de dar una contribución al sitio de modulación reportado en la literatura.

Se incrustó al nAChR $\alpha 7$ en una bicapa lipídica, formado por fosfolípidos POPC (1-palmitoil,2-oleoilfosfatidilcolina) y se agregaron moléculas de agua e iones para simular un entorno biológico. Sin embargo, se eliminó las moléculas de agua en las imágenes de los sitios para poder apreciar el sitio de unión, no obstante, se tomaron en cuenta las interacciones formadas por el disolvente, el ligando y el nAChR $\alpha 7$.

10.2.1 Sitio de unión 1 con membrana

De acuerdo con la Figura 20, el sitio de unión se encuentra en la interfaz del ECD de dos subunidades $\alpha 7$ (C y D), principalmente formado por las láminas β plegadas internas de ambas subunidades ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 5$, $\beta 6$ y $\beta 8$).

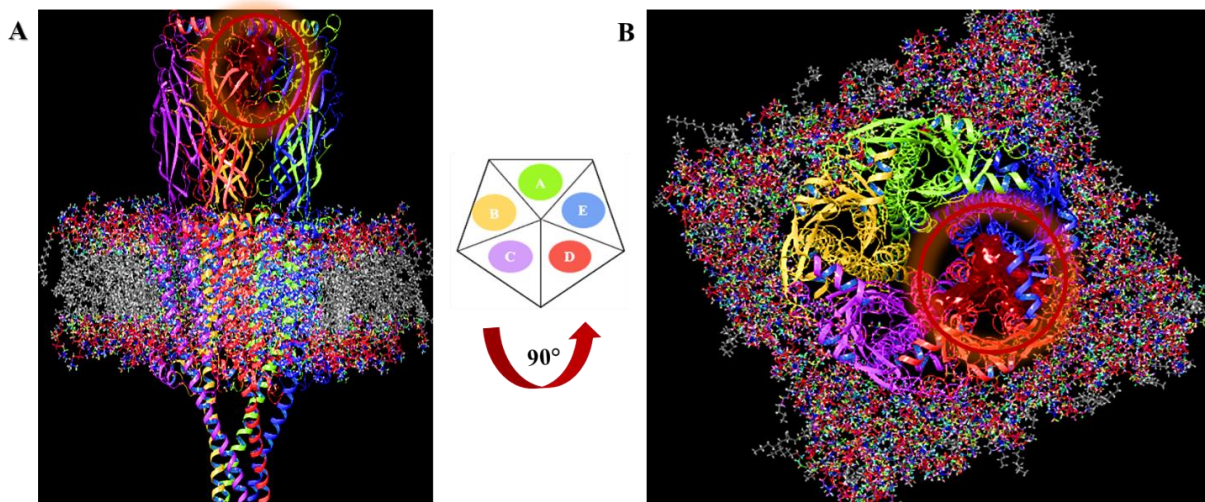


Figura 57. Sitio de unión 1 con membrana celular. Se ilustra el primer sitio de unión con membrana y la estructura proteica del nAChR $\alpha 7$. A) Se muestra una vista lateral del sitio de unión 1 con membrana, donde la cavidad se destaca en color rojo y está ubicada principalmente en el dominio extracelular. B) Se muestra una vista superior del sitio 1, evidenciando que la cavidad se encuentra en la interfaz de dos subunidades $\alpha 7$ (D y E).

El sitio de unión con membrana se encuentra en el dominio extracelular celular del nAChR $\alpha 7$, este dominio celular es el mismo que anteriormente se reportó en el *docking* molecular sin membrana de este mismo trabajo, sin embargo, al analizar los datos numéricos de los parámetros fisicoquímicos de la Tabla 5, se puede encontrar que los valores con membrana varían en comparación con el docking sin membrana, se puede rescatar que la interacción con membrana es favorecida por un valor de Kd más bajo para el (-)-CBD y un LE más alto, caso que no sucede con el diastereoisómero (+)-CBD.

Tabla 5. *Docking score* y constantes de afinidad y eficiencia de enlace para los diferentes ligandos del sitio 1 con membrana

SITIO 1			
Molécula	Docking Score (kJ/mol)	Kd [M] (cálculado)	LE (kJ/mol*átomos distintos a H)
(-)-CBD	-6.129	0.084	-0.266
(+)-CBD	-3.902	0.207	-0.170

Los valores de la Tabla 5 son consecuencia de las interacciones moleculares formadas por el ligando y el receptor. Por ejemplo, en la Figura 60 el (-)-CBD en este caso forma dos puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilos del ligando y los residuos aminoácidos Lys 109 y Asp 104. Específicamente se crea una interacción electrostática formada por los diferentes dipolos creados en los dos grupos hidroxilos y los grupos carbonilos de los residuos aminoácidos anteriormente

mencionados. De igual forma, se crea una interacción del tipo π -catión entre el anillo aromático del (-)-CBD y la amina protonada de la Lys 109. La relevancia de la polarización en las interacciones π -catión y en el enlace de hidrógeno son de suma importancia para el reconocimiento celular del (-)-CBD.

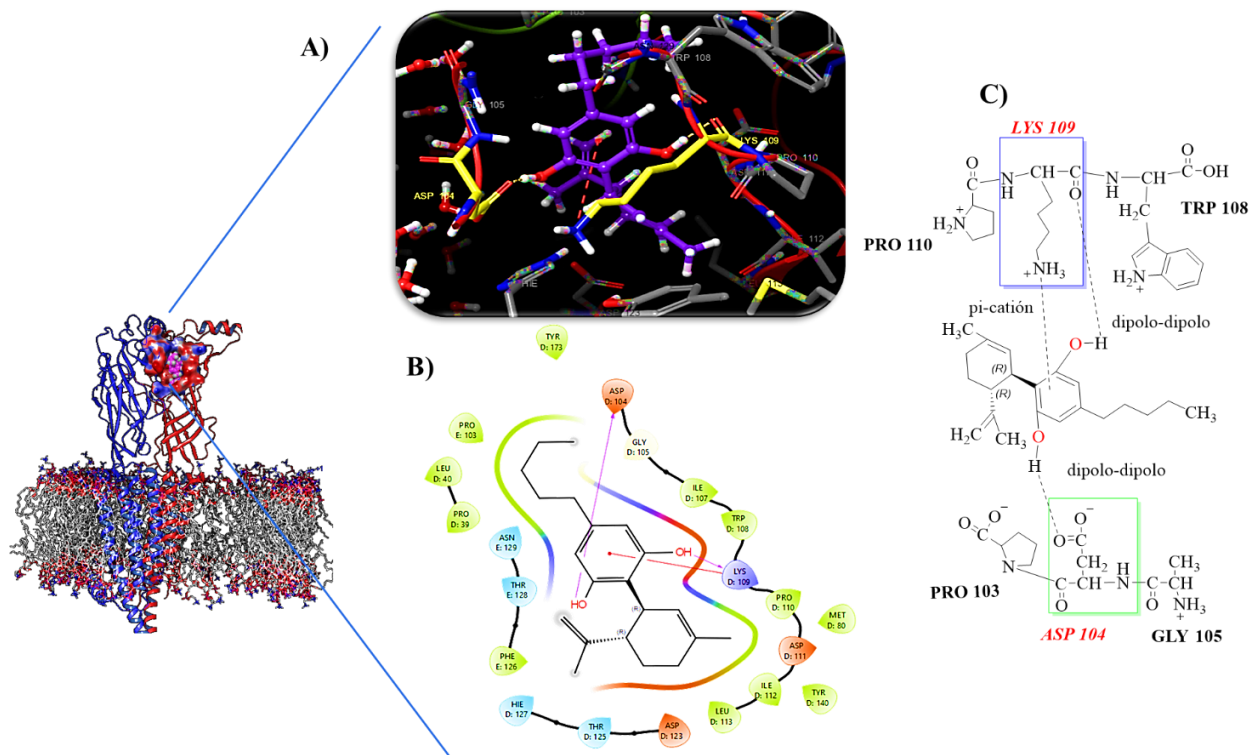


Figura 58. Representación esquemática del sitio de unión 1 con membrana del (-)-CBD. A) Vista 3D del sitio de unión 1 con membrana para el ligando (-)-CBD. Se muestran los residuos aminoácidos y los enlaces formados por el ligando y el receptor. En color amarillo aparecen los residuos (Lys 109 y Asp 104) con mayor participación para la estabilización del complejo ligando-proteína, el sitio de unión es representativo para la interfaz de las dos subunidades $\alpha 7$ D y E. B) Vista 2D del sitio de interacción por arte del (-)-CBD en el nAChR $\alpha 7$, se puede notar la presencia de aminoácidos de carácter hidrófobo principalmente (Pro 103, Leu 40 Pro, 39 Ile 107, Pro 110, entre otros.) C) Representación 2 D de las 2 principales interacciones moleculares formadas por el (-)-CBD, las líneas punteadas indican la interacción por puente de hidrógeno llevada en los grupos OH del ligando con los residuos aminoácidos Lys 109 y Asp 104 de la subunidad $\alpha 7$ D. La interacción π -catión se da entre el anillo aromático del (-)-CBD y la amina protonada del residuo aminoácido Lys 109 de la misma subunidad α .

Por el contrario, la Figura 61 ilustra que el compuesto (+)-CBD no establece enlaces de hidrógeno, aunque los aminoácidos Lys 109 y Asp 104 siguen estando en el sitio de unión. Además, se observa que la estabilidad del ligando es principalmente atribuida a los aminoácidos no polares.

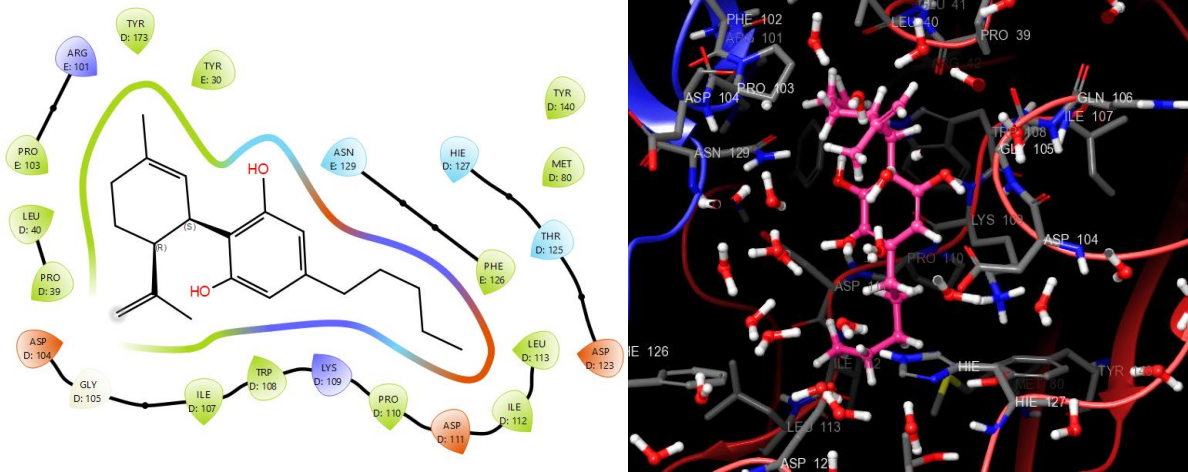


Figura 59. Representación esquemática del sitio de unión 1 con membrana del (+)-CBD. Se muestra la vista 2D y 3D del sitio de unión 1 con membrana para el ligando (+)-CBD, el sitio de unión es predominante para aminoácidos apolares.

10.2.2 Sitio de unión 2 con membrana

En la Figura 62 se muestra el sitio de unión 2 que está formado por la interfaz de las subunidades $\alpha 7 E$ y $\alpha 7 A$ en el dominio extracelular de ambas subunidades α . Este bolsillo está mayormente compuesto por láminas internas β plegadas que hacen contacto con el poro iónico. Esta característica es relevante ya que el racemato podría interactuar con el agua y los iones que se encuentran presentes en el poro.

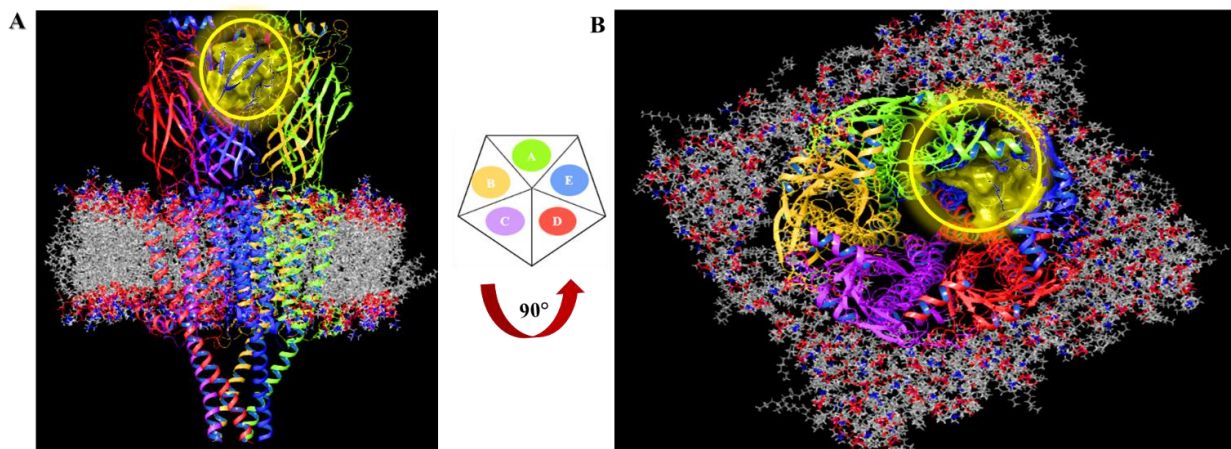


Figura 60. Sitio de unión 2 con membrana celular. Se ilustra el segundo sitio de unión con membrana y la estructura proteica del nAChR $\alpha 7$. A) Se muestra una vista lateral del sitio de unión 2 con membrana, donde la cavidad se destaca en color amarilla y está ubicada principalmente en el dominio extracelular. B) Se muestra una vista superior del sitio 2, evidenciando que la cavidad se encuentra en la interfaz de dos subunidades $\alpha 7$ (E y A).

De acuerdo con la Figura 63, es importante la formación de 2 puentes de hidrógeno entre el residuo aminoacídico Asp 104 y Lys 109 de la subunidad $\alpha 7$ junto con los 2 grupos hidroxilo del (-)-CBD. Existe una polarización del enlace covalente que mantiene unido al átomo de oxígeno con el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo del ligando, al ser un átomo electronegativo el oxígeno retira densidad electrónica del hidrógeno para que este tenga una carga parcial positiva, posteriormente el momento dipolar del grupo carbonilo del Asp 104 forma una interacción dipolo- dipolo que ayuda a estabilizar en complejo ligando-proteína.

En cambio, el otro puente de hidrógeno es formado por la polarización del grupo hidroxilo libre del (-)-CBD, en donde el átomo de hidrógeno queda cargado parcialmente positivo y al interactuar con el momento dipolar del grupo carbonilo del residuo aminoacídico Lys 109 de la subunidad $\alpha 7$ E forma una interacción electrostática dipolo-dipolo.

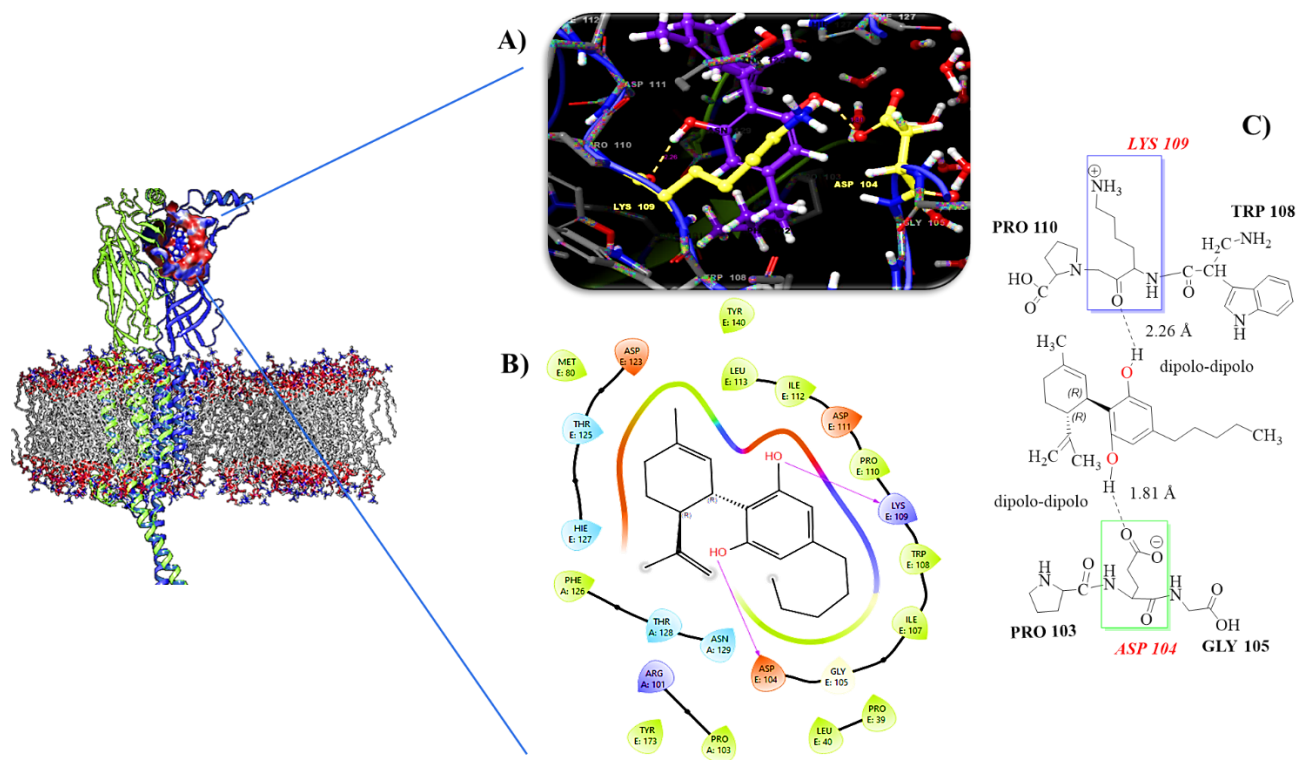


Figura 61. Representación esquemática del sitio de unión 2 con membrana del (-)-CBD. A) Vista 3D del sitio de unión 2 con membrana para el ligando (-)-CBD. Se muestran los residuos aminoácidos y los enlaces formados por el ligando y el receptor. En color amarillo aparecen los residuos (Lys 109 y Asp 104) con mayor participación para la estabilización del complejo ligando-proteína, el sitio de unión es representativo para la interfaz de las dos subunidades $\alpha 7$ E y A. B) Vista 2D del sitio de interacción por arte del (-)-CBD en el nAChR $\alpha 7$, se puede notar la presencia de aminoácidos de carácter hidrófobo principalmente (Pro 103, Leu 40 Pro, 39 Ile 107, Pro 110, entre otros.) C) Representación 2 D de las 2 principales interacciones moleculares formadas por el (-)-CBD, las líneas punteadas

indican la interacción por puente de hidrógeno llevada en los grupos OH del ligando con los residuos aminoácidos Lys 109 y Asp 104 de la subunidad $\alpha 7$ E.

Al examinar la Figura 64 se observan los residuos de aminoácidos y las interacciones que mantienen estable al compuesto (+)-CBD, revelando la presencia de un puente de hidrógeno entre un grupo hidroxilo del compuesto y el aminoácido Asp 104 de la subunidad $\alpha 7$.

Puntualmente se lleva una interacción electrostática del tipo dipolo-dipolo entre en la carga parcial negativa en el grupo carbonilo del aminoácido y la carga parcial positiva del átomo de hidrógeno del hidroxilo, la estabilización de la molécula se llevó principalmente por la interacción de residuos aminoácidos no polares, ya que pueden tener una distribución temporal no simétrica de la densidad de electrones que resulta en la generación de dipolos temporales.

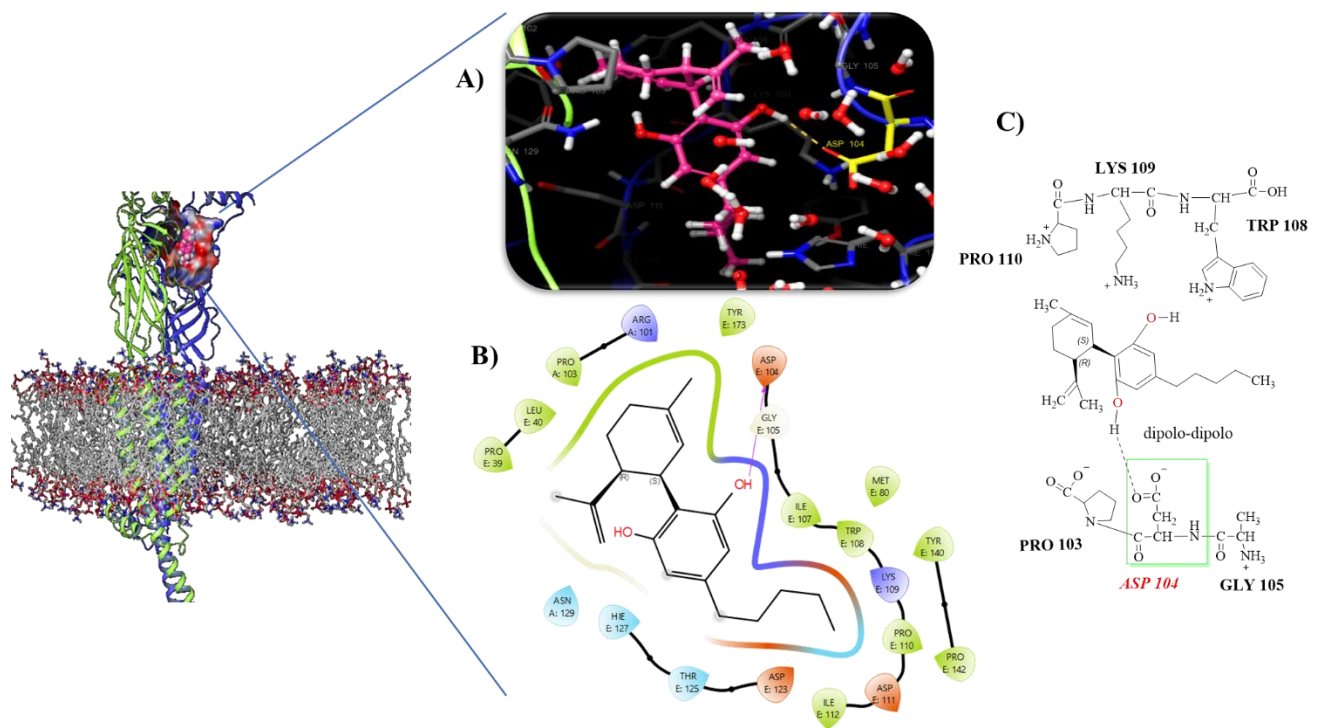


Figura 62. Representación esquemática del sitio de unión 2 con membrana del (+)-CBD. A) Vista 3D del sitio de unión 2 con membrana para el ligando (+)-CBD, se muestra al residuo aminoácido Asp 104 de la subunidad $\alpha 7$ E de color amarillo. B) Vista 2D del sitio de interacción por parte del (+)-CBD en el nAChR $\alpha 7$, se puede notar la presencia de aminoácidos de carácter hidrófobo principalmente (Pro 103, Leu 40 Pro, 39 Ile 107, Pro 110, entre otros.) C) Representación 2 D de la principal interacción molecular formada por el (+)-CBD, las líneas punteadas indican el puente de hidrógeno llevada en el grupo OH del ligando con el residuo aminoácido Asp 104 de la subunidad $\alpha 7$ E.

Este tipo de naturaleza aminoacídica que existe en este sitio de unión y cómo influye en la interacción molecular, es derivado de las fuerzas fisicoquímicas que rigen el sistema, la Tabla 6 recoge los principales parámetros fisicoquímicos evaluados por este experimento, en donde el (-)-

CBD sigue siendo más afín hacia el nAChR $\alpha 7$, esto puede ser por la cooperatividad que existe en las interacciones débiles (puentes de hidrógeno) entre el ligando y el receptor.

Tabla 6. Docking score y constantes de afinidad y eficiencia de enlace para los diferentes ligandos del sitio 2 con membrana.

SITIO 2			
Molécula	Docking Score (kJ/mol)	Kd [M] (calculado)	LE (kJ/mol*átomos distintos a H)
(-)-CBD	-6.187	0.082	-0.269
(+)-CBD	-4.489	0.163	-0.195

Es importante de mencionar que a pesar de ser un estereoisómero el (+)-CBD, el centro asimétrico que existe en este ligando sigue influyendo en la interacción selectiva del receptor. Por otro lado, el residuo aminoacídico Gly 105 sigue participando activamente en la interacción, apareciendo en ambos sitios de unión de los 2 ligandos.

10.2.3 Sitio de unión 3 con membrana.

Como se observa en la Figura 65 el sitio de unión está conformado por la interfaz de las subunidades $\alpha 7$ A y B, y el dominio extracelular. El sitio tiene contacto con el poro iónico consecuencia de la interacción de los ligandos con las láminas β plegadas internas de las 2 subunidades $\alpha 7$.

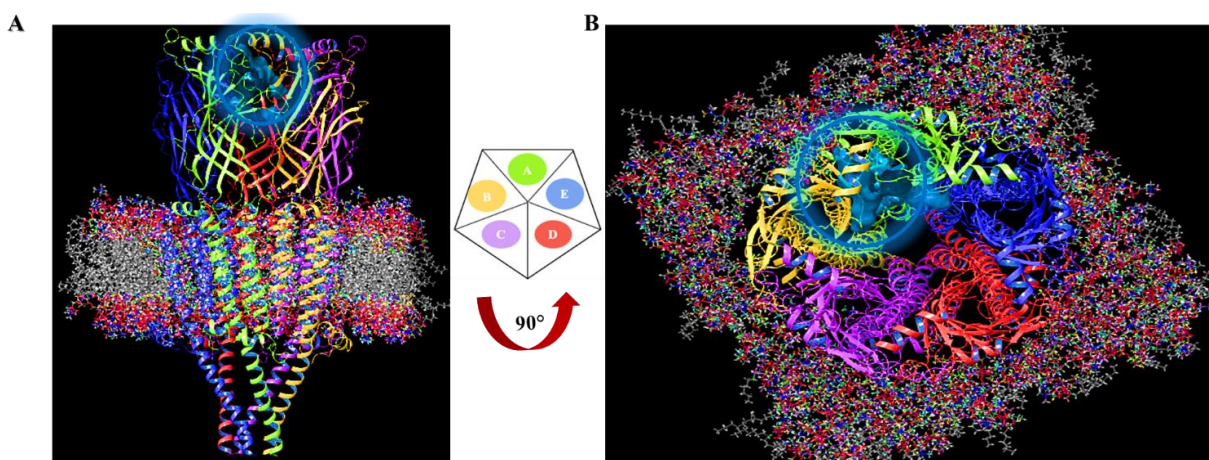


Figura 63. Sitio de unión 3 con membrana celular. Se muestra el tercer sitio de unión con membrana y la estructura proteica del nAChR $\alpha 7$. A) Se muestra una vista lateral del sitio de unión 3 con membrana, donde la cavidad se destaca en color azul y está ubicada principalmente en el dominio extracelular. B) Se muestra una vista superior del sitio 3, evidenciando que la cavidad se encuentra en la interfaz de dos subunidades $\alpha 7$ (A y B).

En la Figura 66 se observa como el compuesto (-)-CBD forma dos puentes de hidrógeno en este sitio: uno se forma mediante la interacción polar entre el grupo hidroxilo del compuesto y el grupo carbonilo presente en el Asp 104 (dipolo-dipolo). Por otro lado, el puente de hidrógeno formado por la Lys 109 surge de la interacción entre la densidad electrónica negativa presente en el grupo carbonilo del aminoácido y el átomo de hidrógeno presente en el grupo hidroxilo del (-)-CBD, generando una interacción electrostática tipo dipolo-dipolo. Además, existe una interacción del tipo π -catión entre el residuo aminoácido Lys 109, en donde la densidad electrónica de la amina cuaternaria interacciona con el anillo aromático presente en la molécula del (-)-CBD.

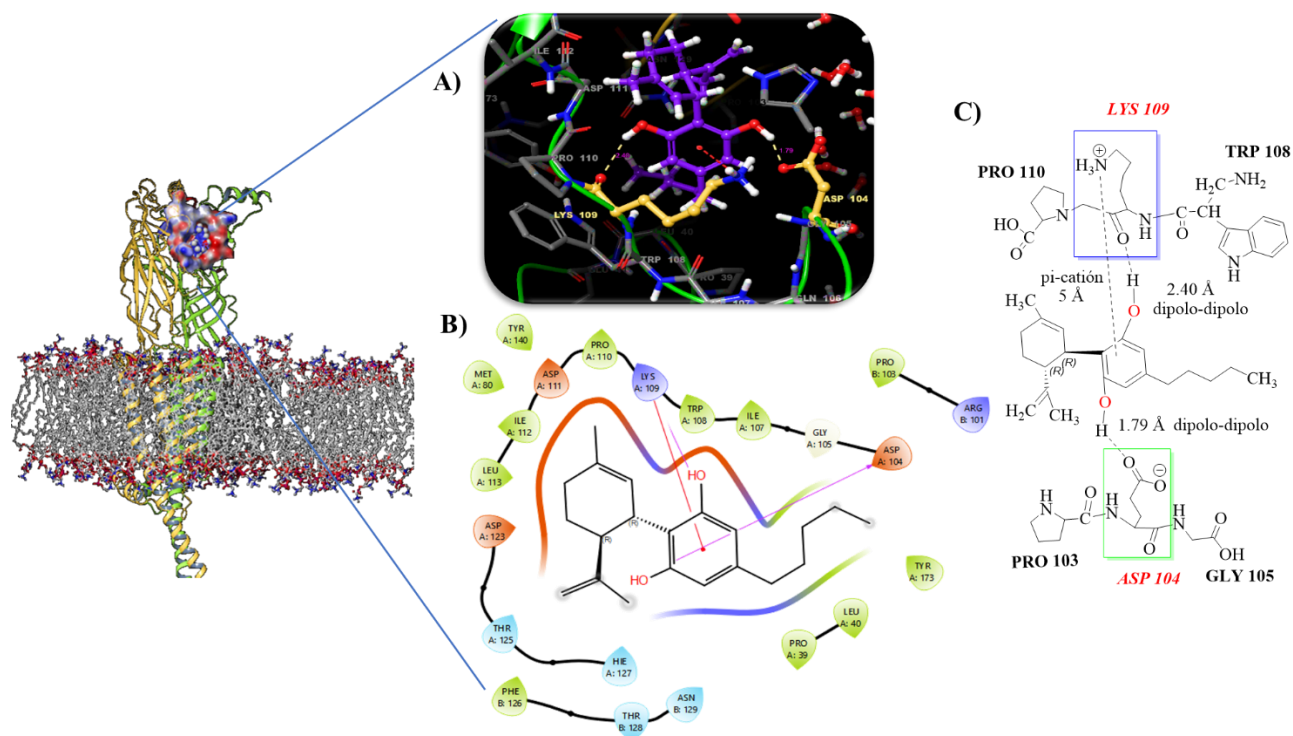


Figura 64. Representación esquemática del sitio de unión 3 con membrana del (-)-CBD. A) Vista 3D del sitio de unión 2 con membrana para el ligando (-)-CBD. Se muestran los residuos aminoácidos y los enlaces formados por el ligando y el receptor. En color amarillo aparecen los residuos (Lys 109 y Asp 104) con mayor participación para la estabilización del complejo ligando-proteína, el sitio de unión es representativo para la interfaz de las dos subunidades $\alpha 7$ A y B. B) Vista 2D del sitio de interacción por arte del (-)-CBD en el nAChR $\alpha 7$, se puede notar la presencia de aminoácidos de carácter hidrófobo principalmente (Pro 103, Leu 40 Pro, 39 Ile 107, Pro 110, entre otros.) C) Representación 2 D de las 2 principales interacciones moleculares formadas por el (-)-CBD, las líneas punteadas indican la interacción por puente de hidrógeno llevada en los grupos OH del ligando con los residuos aminoácidos Lys 109 y Asp 104 de la subunidad $\alpha 7$ A. La interacción π -catión se da entre el anillo aromático del (-)-CBD y la amina protonada del residuo aminoácido Lys 109 de la misma subunidad α .

En la Figura 67, el compuesto (+)-CBD establece un puente de hidrógeno entre su grupo hidroxilo y el residuo aminoácido Asp 104 de la subunidad $\alpha 7$ A del nAChR $\alpha 7$. En esta interacción, la

polaridad del enlace O-H del grupo hidroxilo del compuesto se relaciona con el dipolo generado por el grupo carbonilo del Asp 104. Resaltando la predominancia de residuos aromáticos no polares en el complejo de unión ligando-receptor.

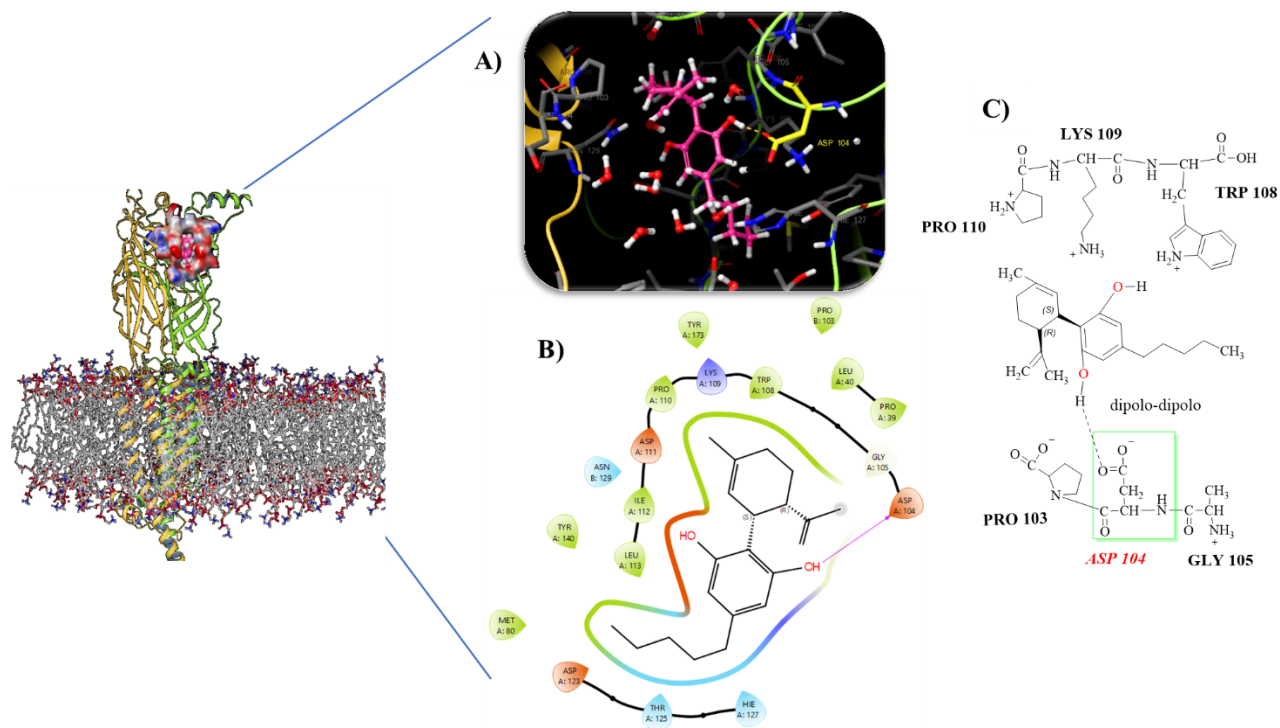


Figura 65. Representación esquemática del sitio de unión 3 con membrana del (+)-CBD. A) Vista 3D del sitio de unión 3 con membrana para el ligando (+)-CBD, se muestra al residuo aminoacídico Asp 104 de la subunidad $\alpha 7$ A de color amarillo. B) Vista 2D del sitio de interacción por parte del (+)-CBD en el nAChR $\alpha 7$, se puede notar la presencia de aminoácidos de carácter hidrófobo principalmente (Pro 103, Leu 40 Pro, 39 Ile 107, Pro 110, entre otros.) C) Representación 2 D de la principal interacción molecular formada por el (+)-CBD, las líneas punteadas indican el puente de hidrógeno llevada en el grupo OH del ligando con el residuo aminoacídico Asp 104 de la subunidad $\alpha 7$ A.

Por otro lado, los parámetros fisicoquímicos de afinidad representados en la Tabla 7, muestra que el ligando (-)-CBD sigue siendo más afín por el nAChR $\alpha 7$ en comparación con el (+)-CBD, a pesar de que comparten la misma composición química en cuestión de átomos la eficiencia de enlace es distinta, esto se le atribuye a la quiralidad del carbono asimétrico presente en la parte terpenólica que une al anillo de resorcinol presente en el Cannabidiol.

Tabla 7. *Docking score* y constantes de afinidad y eficiencia de enlace para los diferentes ligandos del sitio 3 con membrana.

SITIO 3			
Molécula	Docking Score (kJ/mol)	Kd [M] (calculado)	LE (kJ/mol*átomos distintos a H)
(-)-CBD	-5.189	0.123	-0.226
(+)-CBD	-4.529	0.161	-0.197

Cabe resaltar, que los residuos aminoacídicos Lys 109, Asp 104 y Gly 105 son predominantes en todos los sitios de unión, teniendo una gran relevancia para una mutación de estos residuos y ver si realmente son los aminoácidos claves para la interacción ligando-receptor.

11. Discusión de resultados

La ACh permitió demostrar en 1921 la teoría química de la neurotransmisión, siendo el primer neurotransmisor caracterizado en el SNP como en el SNC de los mamíferos (Albuquerque *et al.*, 2009).

La función fisiológica de la ACh en el cerebro de mamíferos involucra principalmente la activación del receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR), lo que resulta en la entrada de iones calcio y sodio en la célula. Esto conduce a la despolarización de la membrana celular, aumentando la susceptibilidad de las neuronas sensibles a este neurotransmisor a otras influencias excitatorias. De tal forma que, la ACh media la transmisión de los impulsos nerviosos para provocar la contracción neuromuscular y participar activamente en los circuitos neuronales asociados con la cognición, la memoria, el aprendizaje y la atención (Nielsen *et al.*, 2019; Wills *et al.*, 2022).

En relación con los receptores nicotínicos de acetilcolina de naturaleza ionotrópica, como lo es el nAChR $\alpha 7$, se ha reportado que estos canales iónicos son proteínas necesariamente transmembranales que forman un poro hidratado permeable mayoritariamente a iones calcio (Wills *et al.*, 2022). Este diseño estructural obliga a la proteína a cumplir con regulaciones impuestas por los dominios celulares extra, intra y transmembranal del nAChR $\alpha 7$, de tal manera que estos segmentos influyen en la función de este receptor.

11.1 *Docking* molecular.

El proceso de activación del nAChR $\alpha 7$ comienza con la unión del ligando agonista ACh o nicotina al sitio de unión ortostérico, esta unión provoca un movimiento rotacional para abrir el poro iónico

con una reorganización significativa de los enlaces de hidrógeno presentes en los aminoácidos cercanos al sitio de unión ortostérico. Esto resulta en cambios de la posición relativa de los loops que conectan las láminas β plegadas del dominio extracelular, girando así la superficie extracelular del pentámero afectando la posición de los residuos aminoacídicos de las hélices α del segmento TM2 presentes en el TMD, de tal manera, que se reubican residuos hidrofílicos hacia el interior del poro para facilitar el paso de iones al interior de la célula (Nielsen *et al.*, 2018; Noviello *et al.*, 2021).

Los resultados de unión proporcionados por el *docking* molecular sin y con membrana reportaron la existencia de 3 sitios posibles para la modulación del nAChR $\alpha 7$. Estos sitios se encuentran principalmente en el ECD de cada subunidad $\alpha 7$ y según la literatura el (-)-CBD no se une en el sitio de unión del ligando endógeno ni en el sitio transmembranal intersubunidad del nAChR $\alpha 7$ (Bertrand *et al.*, 2008; Mahgoub *et al.*, 2013; Chrestia *et al.*, 2022), sin embargo, está presente en el dominio extracelular, dominio donde se encuentra el sitio de unión ortostérico para la activación del nAChR $\alpha 7$.

El (-)-CBD se une a 3 sitios de naturaleza hidrofóbica presentes en el nAChR $\alpha 7$, estos 3 sitios son alostéricos y al estar cerca en el mismo dominio celular del sitio de unión ortostérico pueden ocluir o interrumpir parcialmente el sitio del ligando endógeno, es decir, los ligandos cannabinoides al tener mejor afinidad en comparación con la ACh y la nicotina podrían afectar el sitio topográfico del ligando nativo, de tal manera que se favorece una estabilización del estado cerrado afectando la apertura del poro iónico del nAChR $\alpha 7$ (Mahgoub *et al.*, 2013; Chrestia *et al.*, 2022).

De igual forma, los resultados obtenidos indican que los aminoácidos Gly 105, Pro 103 y Pro 110 eran repetitivos en los 3 sitios de unión sin y con membrana, lo que sugiere la importancia que estos dos residuos para la actividad moduladora dentro de las láminas β plegadas internas del nAChR $\alpha 7$.

Glicina y Prolina se encuentran con frecuencia en los giros β , siendo aminoácidos importantes porque son elementos de conexión que unen tramos sucesivos permitiendo que las láminas β encajen juntas y empaqueten al ligando unas sobre otras, es decir, las proteínas con una estructura de plegamiento compacta en el dominio extracelular presentan aproximadamente un tercio de los

residuos de aminoácidos en giros o bucles donde la cadena polipeptídica cambia de dirección, estos son elementos de conexión que unen tramos sucesivos llamados giro β (Nelson y Cox 2017).

En el caso de la glicina debido a que es un residuo pequeño y flexible puede ser útil para la adaptabilidad del sitio de unión, de tal forma, que permita cambios en el sitio que permita al nAChR $\alpha 7$ alojar diferentes ligandos cannabinoides. Mientras que para Pro puede introducir rigidez en el sitio de unión, potencialmente afectando la adaptabilidad del receptor a diferentes ligandos, influyendo en la capacidad del receptor para reconocer y unirse a la acetilcolina o a otros ligandos.

Considerando ahora que, de los tres sitios, el sitio de unión 2 mostró el valor energético más favorable, debido a que presentó un valor total de *docking score* de -54.463 kJ/mol para la afinidad de las 10 estructuras químicas, en comparación con el sitio 1 con un valor de -52.745 kJ/mol y el valor del sitio 3 con -44.178 kJ/mol.

El sitio 2 está conformado por las subunidades $\alpha 7$ E y $\alpha 7$ A del nAChR $\alpha 7$ con las principales contribuciones de interacción molecular por parte de los residuos aminoácidos Lys 109 y Asp 104, este sitio podría ser evaluado por medio de mutagénesis al modificar los residuos aminoácidos Lys 109, Asp 104 en el ECD de la subunidad $\alpha 7$ E, esto con la intención de poder corroborar la presencia del sitio alostérico modulado por la estructura química del (-)-CBD y sus análogos. De igual forma para confirmar el sitio alostérico se analizar por medio de otros modelados *in silico* como lo es la dinámica molecular, la información obtenida por la dinámica podrá dilucidar como es el mecanismo de influencia de los cannabinoides en el nAChR $\alpha 7$ para la apertura del poro iónico en tiempo real (Noviello *et al.*, 2021).

La posición topográfica del sitio de unión 2 podría provocar que los compuestos cannabinoides bloquen la luz del poro iónico, de tal manera, que puedan ocluir el paso de iones. La poca despolarización resultante, por ejemplo, modularía la comunicación sináptica en interneuronas GABAérgicas y glutamatérgicas del hipocampo y la corteza cerebral (Bouzat *et al.*, 2017; Vallés y Barrantes 2023). De igual forma, se modularía la toxicidad celular causada por el aumento de Ca^{2+} intracelular debido a la sobreestimulación del nAChR $\alpha 7$ (Bouzat *et al.*, 2017).

Es importante mencionar que los ligandos estudiados en este trabajo son importantes prospectos para modular a los nAChR $\alpha 7$ expresados en microglía y astrocitos, debido a que estas células

gliales despiertan interés por su alta permeabilidad al Ca^{2+} así como a su capacidad para activar cascadas de señalización dependientes de iones Ca^{2+} (Wills *et al.*, 2022; Vallés y Barrantes 2023). Por lo tanto, las afinidades propuestas para estos ligandos cannabinoides pueden explicar el potencial neuroprotector a través de efectos antiinflamatorios mediados por los astrocitos y las células micro gliales (Janefjord *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2020).

Por otro lado, se ha demostrado que los endocannabinoides como la AEA y el 2-AG pueden inhibir las corrientes mediadas por la unión de ligandos agonistas del nAChR $\alpha 7$ (Mahgoub *et al.*, 2013; Oz *et al.*, 2022). De acuerdo con los resultados obtenidos por este trabajo de tesis, también se ha encontrado que ligandos del tipo endocannabinoide como la AEA, el 2-AG y el NADA presentan cierta afinidad por el nAChR $\alpha 7$, esto es en los 3 principales sitios descritos por el *docking* molecular sin membrana, de tal manera, que ligandos del tipo endocannabinoide pueden modular la actividad del nAChR $\alpha 7$ al unirse en el dominio extracelular y modificar la apertura del poro iónico de dicho receptor. Por lo tanto, el ligando (-)-CBD y los endocannabinoides sirven como moduladores alostéricos negativos (NAM), que bloquean el canal abierto, inhibiendo alostéricamente la activación o aumentando la desensibilización del nAChR $\alpha 7$ (Mahgoub *et al.*, 2013).

No obstante, el objetivo de investigar estos sitios son las interacciones moleculares que se producen en cada uno de ellos y obtener detalles precisos que puedan guiar la identificación de características específicas en la búsqueda de un ligando prometedor para regular la actividad del nAChR $\alpha 7$. Por lo tanto, a continuación, se discutirá cada sitio alostérico en detalle.

11.1.1 SITIO ALÓSTÉRICO 1

Todos los ligandos representativos para el sitio alostérico 1, tienen un valor de *docking score* negativo, por lo tanto, la K_d será positiva, indicando que los productos están favorecidos a medida que la reacción avanza hacia el equilibrio. Esta relación proporciona información valiosa sobre la dirección y la favorabilidad de la espontaneidad del complejo ligando-receptor.

En la Tabla 1 se puede observar que el ligando que posee mayor afinidad hacia el nAChR $\alpha 7$ es el CBND-C5 con una energía de enlace de -5.98 kJ/ mol. Luego se encuentra el (-)-CBD Abn, seguido de la (-)-CBM, el (-)-CBDV, el (-)-CBD y al final el (+)-CBD y la (-)-CBE-C5. Esto es consecuencia del tipo de interacción molecular que se lleva a cabo en el sitio de unión, derivado

de la proporción aminoacídica que hay en sitio del receptor y de la conformación del ligando en dicho sitio. Esto indica que es posible una modulación del receptor ionotrópico, debido a una actividad sinérgica de los cannabinoides en varios receptores iónicos (Patricio *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2021; Mahgoub *et al.*, 2013; Chrestia *et al.*, 2022).

Por ejemplo, los puentes de hidrógeno formados por los 10 compuestos son interacciones electrostáticas del tipo dipolo-dipolo. De los cuales el ácido aspártico 104 y la lisina 109 forman puentes de hidrógeno por la polarización del grupo carbonilo y la interacción de la nube electrónica del grupo hidroxilo de los ligandos (dipolo-dipolo), creando de esta manera una distribución asimétrica de electrones. Por lo tanto, la lisina 109 y el ácido aspártico 104 son residuos aminoacídicos importantes en la interacción con los grupos hidroxilo de cada ligando. Se ha reportado que los aminoácidos polares como el Asp y la Lys influyen en la permeabilidad de cationes en el nAChR $\alpha 7$ (Albuquerque *et al.*, 2009). Por consecuencia la modulación de estos aminoácidos pueden ser clave importante para la apertura o cierre del canal iónico.

Por otro lado, se encontró interacciones moleculares específicas para ciertos ligandos, como el CBND-C5 presentó una interacción π - π , derivado del momento dipolar del anillo aromático libre de grupos hidroxilo y del anillo de aromático de la His 127 de la subunidad D. Esto puede ser crucial para aumentar la afinidad del CBND-C5 al nAChR $\alpha 7$ ya que se ha demostrado que el "apilamiento" de anillos aromáticos, ocurre a menudo en muchos neurotransmisores (Williams and Lemke. 2002).

Existe una interacción iónica significativa en la estabilización del ligando (-)-CBDA, debido a que su grupo funcional con carga negativa, el ácido carboxílico, puede establecer una interacción no covalente con la carga positiva del residuo de aminoácido Lys 109 en la subunidad D. Esta interacción se conoce como puente salino, ya que implica la atracción electrostática entre un grupo de átomos cargados y un enlace de hidrógeno, lo que resulta en una interacción más sólida que un simple enlace de hidrógeno. Este tipo de interacciones iónicas son de suma importancia ya que se ha demostrado que el puente salino actúa como un "clip" molecular que estabiliza la conformación del receptor y puede aumentar la actividad inhibitoria significativamente (Williams and Lemke. 2002).

En cuanto a los ligandos (-)-CBD y (+)-CBD, se observó que el sitio 1 con y sin membrana permaneció en el dominio extracelular del nAChR $\alpha 7$, y que los parámetros fisicoquímicos del *docking* con membrana de ambos ligandos son diferentes al *docking* sin membrana. Esto se puede deber a que la unión del ligando a su receptor celular proteico es el resultado de múltiples interacciones débiles. Una consecuencia del gran tamaño del receptor (en relación con los ligandos) es que su grande superficie proporciona muchas oportunidades para el establecimiento de interacciones débiles (Nelson y Cox 2017).

En el caso del nAChR $\alpha 7$ incrustado en la membrana celular y con la interacción del racemato del Cannabidiol, la interacción se vio favorecida debido a que pueden coexistir mayores interacciones no covalentes que favorezcan la disminución de la entropía y la formación del complejo ligando-receptor, esto es por la formación de mayores interacciones hidrofóbicas principalmente fuerzas de London, en donde la interacción efectiva se da cuando el ligando y el receptor son estéricamente complementarios (Nelson y Cox 2017).

Asimismo, la proporción de aminoácidos del receptor que interactúan con los ligandos se mantuvo constante, independientemente de la presencia o ausencia de membrana, siendo importante la presencia de aminoácidos apolares que hacen al sitio de unión hidrófobo. En particular, hay una convergencia de cadenas laterales de residuos aromáticos invariantes hacia el ligando desde las caras de la subunidad $\alpha 7$ principal (+) y de la subunidad complementaria (-) que interactúan a través de interacciones hidrófobas primordialmente (Albuquerque *et al.*, 2009).

Para el (-)-CBD, se identificaron dos puentes de hidrógeno entre los residuos aminoácidos Lys 109 y Asp 104 con los dos grupos hidroxilo del mismo ligando. En el residuo aminoácido Lys 109 se formó una interacción de naturaleza π -cation. Esta interacción inusual es un ejemplo de enlace no covalente entre un monopolo catiónico (amina de la Lys 109) y un cuadrupolo (sistema π del ligando Cannabidiol). La energía de la interacción catión- π es del mismo orden de magnitud del enlace de hidrógeno o del puente salino, y juega un rol importante en el reconocimiento molecular (Williams and Lemke 2002).

Por otro lado, el (+)-CBD no mostró interacciones relevantes, aunque esto no descarta su posible influencia en la actividad de modulación del nAChR $\alpha 7$. En conclusión, aunque la membrana no

afecta el sitio de unión, las moléculas de agua no pueden tener un efecto significativo en la estabilización del complejo ligando-proteína.

11.1.2 SITIO ALÓSTÉRICO 2

En los resultados obtenidos de la Tabla 2. Se muestra que el ligando CBND-C5 sigue apareciendo con la mejor energía de afinidad para el nAChR $\alpha 7$ con un valor más negativo en comparación con el sitio 1. En cambio, la (-)-CBE-C5 que era el ligando menos a fin en el sitio 1, mostro un aumento en el valor del *docking score* para el sitio 2.

Al analizar los residuos aminoacídicos que se presentaban en este sitio de unión, se determinó que el Asp 104 y la Lys 109 de la subunidad E, eran importantes para la formación de puentes de hidrógeno en todas las estructuras propuestas. Siendo los puentes de hidrógeno la razón principal para la selectividad proteína-ligando.

En el caso más familiar de la interacción por puente de hidrógeno, se considera que el grupo electronegativo (OH) del ligando es capaz de retirar electrones del grupo donante (H⁺) del residuo aminoacídico Asp 104 y Lys 109, dejando al protón parcialmente desprotegido, produciendo una carga positiva parcial neta, dando lugar a una interacción electrostática entre el protón y el oxígeno del grupo hidroxilo. Se ha reportado que el enlace de hidrógeno es más fuerte que las fuerzas hidrofóbicas o de Van Der Waals, siendo una de las principales interacciones intermoleculares predominantes en los complejos biológicos (Nelson y Cox 2017) y que su contribución es predominante a la especificidad del reconocimiento molecular (Williams and Lemke 2002). Los puentes de hidrógeno tienen un efecto positivo porque intensifican la fuerza de atracción por la cooperatividad de 2 o más puentes de hidrógeno, en donde los puentes de hidrógeno requieren una orientación precisa para ser energéticamente significativos (Williams and Lemke 2002).

Existen otros tipos de interacciones presentes en el sitio alostérico 1 que se siguen repitiendo el sitio alostérico 2, como es la interacción π - π del CBND-C5 con la His 127 de la subunidad E y las interacciones π -catión entre los ligandos (-)-CBD Abn y (-)-CBDM con la Lys 109 de la subunidad E. Reforzando la idea de que estas interacciones π - π son exclusivas para la unión y estabilización de estos ligandos en ambos sitios de unión.

Cabe resaltar que existe un puente de hidrógeno que anteriormente no se había visto, que es entre la (-)-CBM y la Ile 107, un residuo aminoacídico de carácter hidrofóbico que utiliza el grupo amida

como grupo donante para interactuar con el grupo electro atractor OH del ciclopentano del ligando. Esto es curioso porque normalmente se asocia a la isoleucina como un residuo altamente apolar, que se encuentra normalmente en el interior de las moléculas proteicas, donde este protegido del contacto con el agua (Nelson y Cox 2017). Por tal motivo, se reconoce a la Ile 107 como otro aminoácido clave para el reconocimiento de la estructura química del (-)-CBD y de sus análogos en el nAChR $\alpha 7$.

Al analizar los sitios de unión con membrana y sin membrana para el (-)-CBD y el (+)-CBD, se encontró que existía una relación aminoacídica igualitaria en ambos experimentos *in silico*, no obstante, los parámetros fisicoquímicos intuyen que el ligando (-)-CBD sigue siendo predilecto para la formación del complejo ligando-receptor.

Para el ligando (-)-CBD se reportó la formación de 2 puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilos del ligando y los residuos aminoacídicos Lys 109 y Asp 104. En comparación con el (+)-CBD que solo formó un enlace de hidrógeno con el Asp 104, donde, la contribución de un solo enlace de hidrógeno depende del entorno local: un enlace de hidrógeno expuesto al disolvente como en el sitio 2 con membrana contribuye significativamente menos a la energía de interacción (Williams and Lemke 2002). Esto explicaría porque el ligando (-)-CBD es favorecido en la interacción ligando receptor.

11.1.3 SITO ALÓSTERICO 3

Al evaluar los resultados del sitio alostérico 3, se encontró que solo 9 estructuras estaban participando en este sitio de unión, a excepción del ligando (-)-CBE-C5 ya que no presentó afinidad por el sitio. Esto puede ser derivado de su estructura química saturada y de la posible repulsión electrónica del oxígeno del grupo hidroxilo y el oxígeno del análogo del tetrahidrofurano. Esto es de importancia porque este ligando solo es selectivo para dos sitios de modulación para el nAChR $\alpha 7$.

Como se ha mencionado en los dos anteriores sitios de unión, esta energía es dependiente del tipo de interacción que se da entre el ligando y el receptor, siendo los residuos aminoacídicos una clave importante para la estabilización del ligando al receptor. Siendo los puentes de hidrógeno un patrón que se repite en casi todos los sitios de unión. Principalmente, son los puentes de hidrógeno formados por al menos un grupo hidroxilo de todos los ligandos y los residuos aminoacídicos ASP

104 y LYS 109 de la subunidad $\alpha 7$ (+). La identidad de los residuos hidrofóbicos de lado positivo determina la afinidad del ligando, mientras que los residuos aportados por la cara negativa determinan la selectividad del ligando (Albuquerque *et al.*, 2009).

Por otro lado, las interacciones π -catión entre los ligandos (-)-CBD y (-)-CBM con el residuo aminoacídico Lys 109 de la subunidad $\alpha 7$ A, siguen siendo importantes y repetitivos para la interacción electrostática entre el receptor y los ligandos. Por último, la interacción π - π de la (-)-CBM y del CBND-C5 con la His 127 es de suma importancia ya que se ha reportado que la interacción π - π es un tipo particular de interacciones hidrofóbicas, que se establece entre moléculas policíclicas insaturadas. Es decir, las interacciones son causadas por la superposición intermolecular de orbitales p en sistemas conjugados π , siendo el caso del anillo aromático de la His 127 y el anillo aromático de todos los ligandos.

Las interacciones que involucran anillos aromáticos contribuyen de manera importante al reconocimiento de proteína-ligando y, concomitantemente, al diseño de fármacos (Noviello *et al.*, 2021). Un ejemplo de la fuerte ganancia en la afinidad de unión que se puede obtener formando una interacción π - π (Williams and Lemke 2002).

Los resultados obtenidos al analizar los ligandos (-)-CBD y (+)-CBD con y sin membrana muestran que los mismos residuos aminoacídicos y subunidades $\alpha 7$ A y $\alpha 7$ B están presentes en ambos casos. Esto sugiere que el mecanismo de modulación para el (-)-CBD no necesariamente debe ser por una vía de membrana. Esta observación podría ser útil para optimizar el uso de recursos computacionales, mejorando la eficiencia y la efectividad en la investigación de nuevos tratamientos, lo que podría conducir al desarrollo de terapias más eficaces para diversas enfermedades.

Por otro lado, las interacciones intermoleculares siguen siendo las mismas para ambos ligandos, como son los dos puentes de hidrógeno formados por un grupo hidroxilo de los ligandos y los residuos aminoacídicos Asp 104 y Lys 109, la energía asociada a esta unión electrostática es derivada de la superposición de nubes electrónicas de dos átomos participes con distinto momento dipolar, es decir, las diferentes distribuciones de carga resulta en una serie de momentos eléctricos de los ligandos y los residuos aminoacídicos Asp 104 y Lys 109 que les confiere cierta afinidad al nAChR $\alpha 7$.

De igual forma se reportó que para el ligando (-)-CBD forma interacciones π -catión, debido a la interacción de la nube electrónica cargada negativamente del sistema π y la carga positiva del nitrógeno de residuo aminoacídico Lys 109. Esta interacción es necesaria para el reconocimiento de ACh por el nAChR $\alpha 7$ (Albuquerque *et al.*, 2009; Bouzat *et al.*, 2017).

12. Relación estructura-actividad del (-)-CBD y sus análogos.

En términos de la actividad estructural que pudiese explicar lo que anteriormente se mencionó, es que el parámetro fisicoquímico Kd, presenta distintos valores para cada ligando en los 3 sitios de unión, derivando en un fenómeno llamado Cooperatividad homotrópica (Williams and Lemke 2002), es decir, la Kd varía en función del grado de saturación de la proteína, por tal motivo la unión de una molécula de ligando produce un cambio conformacional en la proteína que se transmite a los restantes sitios de unión. Este cambio conformacional se traduce en una modificación de la afinidad de la proteína hacia otras moléculas del mismo ligando. Esta interacción física entre sitios distintos se conoce como alosterismo (Williams and Lemke 2002).

En este punto hay que recordar que la energía de estas interacciones depende críticamente de la distancia y son importantes exclusivamente a distancias interatómicas extremadamente pequeñas (menos de 5 angstroms). Así, una complementariedad perfecta entre las formas del sitio de unión y del ligando, que permita el contacto directo de muchos átomos y por consiguiente el establecimiento de un número elevado de enlaces débiles, dará lugar a valores de Kd bajos. Cualquier alteración en la forma del ligando, que no permita ese ajuste perfecto, se traducirá en un aumento importante del valor de Kd (Williams and Lemke 2002).

Los resultados obtenidos por esta tesis demuestran que la selectividad por el sitio alostérico del nAChR $\alpha 7$ por ligandos análogos al (-)-CBD se rigen por interacciones moleculares derivadas de la estructura química de cada ligando. En la Tabla 7 se muestran se recopilan las principales interacciones moleculares para cada ligando cannabinoide en cada sitio del receptor.

Tabla 1. Tipos de interacciones moleculares observadas en este estudio en los tres sitios analizados

Ligando	<i>Pocket</i> de unión 1	<i>Pocket</i> de unión 2	<i>Pocket</i> de unión 3
(-)-CBD	Interacción π -catión y puentes de hidrógeno	Puentes de hidrógeno	Interacción π -catión y puentes de hidrógeno
(+)-CBD	Puentes de hidrógeno	Puentes de hidrógeno	Puentes de hidrógeno
(-)-CBDA	Puentes de hidrógeno y puente salino	Puentes de hidrógeno	Puentes de hidrógeno
(-)-CBDV	Interacción π -catión y puentes de hidrógeno	Puentes de hidrógeno	Puentes de hidrógeno
(-)-CBDVA	Puentes de hidrógeno	Puentes de hidrógeno	Puentes de hidrógeno
(-)-CBE-C5	Puentes de hidrógeno	Puentes de hidrógeno	NO HAY INTERACCIÓN
(-)-CBM	Puentes de hidrógeno	Puentes de hidrógeno	Interacción π -catión, π - π y puentes de hidrógeno,
(-)-CBDM	Interacción π -catión y puentes de hidrógeno	Interacción π -catión y puentes de hidrógeno	Puentes de hidrógeno
CBND-C5	Interacción π - π y puentes de hidrógeno	Interacción π - π y puentes de hidrógeno	Interacción π - π y puentes de hidrógeno
(-)-CBD Abn	Puentes de hidrógeno	Interacción π -catión y puentes de hidrógeno	Puentes de hidrógeno

De acuerdo con los datos presentados en la Tabla 7, se observa que las interacciones más comunes en los tres sitios de unión son los puentes de hidrógeno y las interacciones electrostáticas π -catión. Estas interacciones son predominantes en el anillo de resorcinol que se encuentra en la mayoría de los ligandos, demostrando que el resorcinol es el farmacóforo al presentar características estéricas y electrónicas específicas que son esenciales para asegurar una interacción molecular efectiva con el nAChR $\alpha 7$, ya sea para activar o inhibir su respuesta biológica (Williams and Lemke 2002)

Como se puede ver en la Figura 67, la LE fue otro parámetro fisicoquímico que se evaluó en esta tesis, con la intención de dilucidar el efecto estérico y la modificación estereoquímica de todos los ligandos. Los resultados obtenidos revelan que el CBND-C5 es la molécula que posee un mayor valor para la eficiencia de enlace con respecto al (-)-CBD, sin embargo, una alta afinidad hacia el receptor puede ser contraproducente ya que se produce una toxicidad por parte del fármaco (Williams and Lemke 2002).

De igual forma en la Figura 67, se puede notar que al variar la polaridad de las moléculas o ligandos pudiese estar relacionada con la afinidad del nAChR $\alpha 7$, es decir, si se toma de referencia al (-)-CBD que presenta una eficiencia de enlace bastante moderada, se puede notar que la hidrofobicidad del CBND-C5 influye significativamente en la interacción con el sitio de unión, en cambio el ligando (-)-CBDA al ser más polar en comparación con el CBND-C5 se encuentra desfavorecida la unión con el sitio. En conjunto, estos resultados muestran que los ligandos de molécula pequeña que se unen a su objetivo con alta eficiencia son más hidrofóbicos y que las interacciones hidrofóbicas son un factor determinante para una mayor eficiencia del ligando.

Por lo tanto, la eficiencia de ligando es dependiente del carácter polar, del tamaño de la molécula y también de quiralidad estructural, donde ligandos de menor peso molecular van a tener mejores eficiencias en promedio que ligandos más grandes. La principal causa para esto es que a medida que el ligando crece en tamaño se reduce la calidad de la unión entre este y el receptor, ya que ligandos más grandes y complejos complican la entrada hasta el sitio activo del receptor.

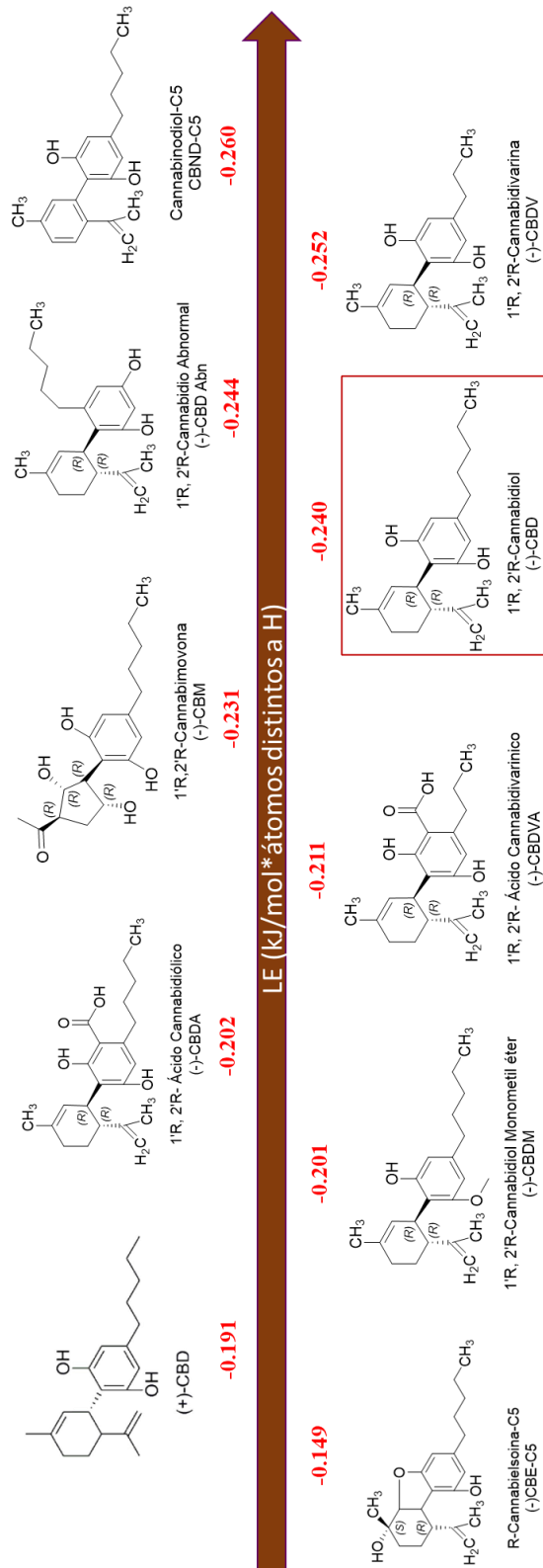


Figura 66. Relación de la estructura de los ligandos ocupados con la eficiencia de enlace formado en el complejo ligando-receptor.

13. Conclusión

- El (-)-CBD y sus análogos pueden modular la actividad del nAChR $\alpha 7$, al unirse en más de 2 sitios alostéricos hidrofóbicos, en un modelo de *docking* molecular sin membrana. Donde la hidrofobicidad, la polaridad y la quiralidad influyen en la afinidad del ligando, de igual forma, los residuos aminoacídicos Lys 109 y Asp 104 presentes en los sitios de unión son de relevancia para la estabilización de los ligandos del tipo (-)-CBD, ya que son los residuos aminoacídicos responsables de la formación de puentes de hidrógeno, π -catión y π - π . Por otro lado, la influencia de los aminoácidos Gly 105 y Pro 110 y 103 en el sitio de unión alostérico son necesarios para acomodar cada ligando al doblar las láminas β plegadas del EDC del nAChR $\alpha 7$.
- El ligando (-)-CBD y (+)-CBD modulan la actividad del nAChR $\alpha 7$, al unirse en más de 2 sitios alostéricos hidrofóbicos, en un modelo de *docking* molecular con membrana. Donde la influencia de la quiralidad es un factor importante para la afinidad de un ligando especificado, de igual forma, los residuos aminoacídicos Lys 109 y Asp 104 son de relevancia para la estabilización de los ligandos. Estos residuos aminoacídicos son los responsables de la formación de puentes de hidrógeno y π -catión con el nAChR $\alpha 7$. Por otro lado, la influencia de los aminoácidos Gly 105 y Pro 110 y 103 en el sitio de unión alostérico son necesarios para acomodar cada ligando al doblar las láminas β plegadas del EDC del nAChR $\alpha 7$.

14. Perspectivas

Los resultados obtenidos en este estudio han demostrado una fuerte correlación entre la estructura química del (-)-CBD y su afinidad por el nAChR $\alpha 7$. De tal manera que una de las aplicaciones más prometedoras de estos resultados es en el desarrollo de nuevos fármacos que exploten la afinidad de estructuras químicas similares al (-)-CBD por el nAChR $\alpha 7$. Esto incluye la síntesis de nuevos análogos y la evaluación de sus propiedades farmacológicas en estudios preclínicos y clínicos.

La investigación futura puede seguir analizando los sitios de unión obtenidos por este trabajo de tesis a través de otros modelados *in silico* como lo es la Dinámica Molecular, esto con la intención de observar el comportamiento cinético del nAChR $\alpha 7$ en presencia de estos ligandos y por métodos *in vitro* mediante la mutación de los aminoácidos clave para el reconocimiento de ligandos del tipo (-)-CBD en el nAChR $\alpha 7$.

Los hallazgos de esta investigación también pueden influir en la formulación de políticas públicas relacionadas con la regulación del cannabis medicinal y sus derivados. De tal manera, que se sugiere que los legisladores consideren la evidencia científica emergente al diseñar marcos regulatorios que faciliten la investigación y el desarrollo de nuevos tratamientos mientras se protegen los derechos y la seguridad de los pacientes.

En resumen, las diversas perspectivas que emergen de los hallazgos de esta investigación no solo enriquecen el campo de estudio, sino que también ofrecen una ruta para futuras investigaciones y aplicaciones prácticas, subrayando la importancia de una aproximación interdisciplinaria y ética en la investigación científica.

15. Referencias

1. Albuquerque, E. X., Pereira, E. F. R., Alkondon, M., & Rogers, S. W. (2009). Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function. *Physiological Reviews*, 89(1), 73-120. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2008>
2. Bertrand, D., Bertrand, S., Cassar, S., Gubbins, E. J., Li, J., & Gopalakrishnan, M. (2008). Positive Allosteric Modulation of the $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor: Ligand Interactions with Distinct Binding Sites and Evidence for a Prominent Role of the M2-M3 Segment. *Molecular Pharmacology*, 74(5), 1407-1416. <https://doi.org/10.1124/mol.107.042820>
3. Bisogno, T., Hanüs, L., De Petrocellis, L., Tchilibon, S., Ponde, D. E., Brandi, I., Moriello, A. S., Davis, J. B., Mechoulam, R., & Di Marzo, V. (2001). Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *British Journal Of Pharmacology*, 134(4), 845-852. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704327>
4. Bouzat, C., Lasala, M., Nielsen, B. E., Corradi, J., & Del Carmen Esandi, M. (2017). Molecular function of $\alpha 7$ nicotinic receptors as drug targets. *The Journal Of Physiology*, 596(10), 1847-1861. <https://doi.org/10.1113/jp275101>
5. Burstein, S. (2015). Cannabidiol (CBD) and its analogs: a review of their effects on inflammation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(7), 1377-1385. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.01.059>
6. Cheng, H., Chen, F., Zhang, S., Wu, Z., Zhao, C., Melcher, K., Zhang, C., Jiang, Y., Yao, C., & Xu, H. E. (2015). Crystallization scale purification of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor from mammalian cells using a BacMam expression system. *Acta Pharmacologica Sinica*, 36(8), 1013-1023. <https://doi.org/10.1038/aps.2015.34>
7. Chrestia, J. F., Del Carmen Esandi, M., & Bouzat, C. (2022). Cannabidiol as a modulator of $\alpha 7$ nicotinic receptors. *Cellular And Molecular Life Sciences*, 79(11). <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04600-y>
8. Dennis, D. G., Anand, S. D., Lopez, A. J., Petrovčič, J., Das, A., & Šarlah, D. (2022). Synthesis of the Cannabimovone and Cannabifuran Class of Minor Phytocannabinoids and Their Anti-inflammatory Activity. *The Journal Of Organic Chemistry*, 87(9), 6075-6086. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.2c00336>
9. Duran Becerra, Constanza. Repositorio Institucional de UAM-Xochimilco: Item withdrawn. (s. f.). <https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/handle/123456789/26310?mode=full>
10. Janefjord, E., Mååg, J. L., Harvey, B. S., & Smid, S. D. (2013). Cannabinoid Effects on β Amyloid Fibril and Aggregate Formation, Neuronal and Microglial-Activated Neurotoxicity In Vitro. *Cellular And Molecular Neurobiology*, 34(1), 31-42. <https://doi.org/10.1007/s10571-013-9984-x>
11. Kim, J., Choi, P., Park, Y. T., Kim, T., Ham, J., & Kim, J. (2023). The Cannabinoids, CBDA and THCA, Rescue Memory Deficits and Reduce Amyloid-Beta and Tau Pathology in an Alzheimer's Disease-like Mouse Model. *International Journal Of Molecular Sciences*, 24(7), 6827. <https://doi.org/10.3390/ijms24076827>
12. Li, H., Liu, Y., Tian, D., Tian, L., Ju, X., Qi, L., Wang, Y., & Liang, C. (2020). Overview of cannabidiol (CBD) and its analogues: Structures, biological activities, and

- neuroprotective mechanisms in epilepsy and Alzheimer's disease. *European Journal Of Medicinal Chemistry*, 192, 112163. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.11216>
13. Li, Y., Ding, Y., Xiao, W., & Zhu, J. (2021). Investigation on the active ingredient and mechanism of *Cannabis sativa* L. for treating epilepsy based on network pharmacology. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 35(1), 994-1009. <https://doi.org/10.1080/13102818.2021.1942208>
 14. Lozano-Aponte, J., & Scior, T. (s. f.). ¿Qué sabe Ud. Acerca de. . . Dinámica Molecular? https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952014000100010
 15. Mahgoub, M., Keun-Hang, S. Y., Sydorenko, V., Ashoor, A., Kabbani, N., Kury, L. A., Sadek, B., Howarth, C. F., Isaev, D., Galadari, S., & Öz, M. (2013). Effects of cannabidiol on the function of $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors. *European Journal Of Pharmacology*, 720(1-3), 310-319. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.10.011>
 16. Mirlohi, S., Bladen, C., Santiago, M., Arnold, J. C., McGregor, I., & Connor, M. (2022). Inhibition of human recombinant T - type calcium channels by phytocannabinoids in vitro. *British Journal Of Pharmacology*, 179(15), 4031-4043. <https://doi.org/10.1111/bph.15842>
 17. Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2017). *Lehninger principles of biochemistry* (7th ed.). W.H. Freeman.
 18. Nielsen Beatriz Elizabeth. *Activación y Modulación Alostérica de Receptores Nicotínicos $\alpha 7$ Homoméricos y Heteroméricos*. Tesis de doctor en bioquímica. UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR (Bahía Blanca). 2019. repositoriodigital.uns.edu.ar/handle/123456789/4937
 19. Noviello, C., Gharpure, A., Mukhtasimova, N., Cabuco, R., Baxter, L., Borek, D., Sine, S. M., & Hibbs, R. (2021). Structure and gating mechanism of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Cell*, 184(8), 2121-2134.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.049>
 20. Oz, M., Yang, K., & Mahgoub, M. (2022). Effects of cannabinoids on ligand-gated ion channels. *Frontiers In Physiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.1041833>
 21. Patricio, F., Morales-Andrade, A. A., Patricio-Martínez, A., & Limón, I. D. (2020). Cannabidiol as a Therapeutic Target: Evidence of its Neuroprotective and Neuromodulatory Function in Parkinson's Disease. *Frontiers In Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.595635>
 22. Ubeed, H. A., Bhuyan, D. J., Alsherbiny, M. A., Basu, A., & Vuong, Q. V. (2022). A Comprehensive Review on the Techniques for Extraction of Bioactive Compounds from Medicinal Cannabis. *Molecules*, 27(3), 604. <https://doi.org/10.3390/molecules27030604>
 23. Vallés, A. S., & Barrantes, F. J. (2023). Nicotinic Acetylcholine Receptor Dysfunction in Addiction and in Some Neurodegenerative and Neuropsychiatric Diseases. *Cells*, 12(16), 2051. <https://doi.org/10.3390/cells12162051>
 24. Von Widdern, J. C., Hohmann, T., & Dehghani, F. (2020). Abnormal Cannabidiol Affects Production of Pro-Inflammatory Mediators and Astrocyte Wound Closure in Primary Astrocytic-Microglial Cocultures. *Molecules*, 25(3), 496. <https://doi.org/10.3390/molecules25030496>
 25. Williams and Lemke. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. 5a edición, Editorial Lippincott Williams and Wilkins. 2002.
 26. Wills, L. P., Ables, J. L., Braunscheidel, K. M., Caligiuri, S. P., Elayouby, K. S., Fillinger, C., Ishikawa, M., Moen, J. K., & Kenny, P. J. (2022). Neurobiological Mechanisms of

- Nicotine Reward and Aversion. *Pharmacological Reviews*, 74(1), 271-310. <https://doi.org/10.1124/pharmrev.121.000299>
27. Wonnacott, S. (2020). Nicotinic receptors. En Springer eBooks (pp. 1-7). https://doi.org/10.1007/978-3-030-21573-6_102-1
28. Zagzoog, A., Mohamed, K. A., Kim, H. J. J., Kim, E. D., Frank, C., Black, T., Jadhav, P. D., Holbrook, L. A., & Laprairie, R. B. (2020). In vitro and in vivo pharmacological activity of minor cannabinoids isolated from *Cannabis sativa*. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77175-y>
29. Zhao, Y., Liu, S., Zhou, Y., Zhang, M., Chen, H., Xu, H. E., Sun, D., Liu, L., & Tian, C. (2021). Structural basis of human $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor activation. *Cell Research*, 31(6), 713-716. <https://doi.org/10.1038/s41422-021-00509-6>