



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CENTRO DE QUÍMICA – INSTITUTO DE CIENCIAS

POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS
DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS
Área de Bioquímica y Biología Molecular

Laboratorio de Neurofarmacología

TESIS DOCTORAL

“Análisis *in silico* del complejo ligando-receptor de GPR55, su implicación en el Globo Pálido externo y las conductas motoras de ratas hemiparkinsonianas”

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS EN EL ÁREA DE
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

PRESENTA

MC. Felipe Patricio Martínez

DIRECTORES

Dr. Ilhuicamina Daniel Limón Pérez de León
Laboratorio de Neurofarmacología
Profesor- Investigador
Facultad de Ciencia Químicas-BUAP



UAB

Universitat Autònoma
de Barcelona

Dr. José Aguilera Ávila
Investigador – Facultad de Medicina
Institut de Neurociències
Universitat Autònoma de Barcelona, España

JOSE
AGUILERA
AVILA - DNI
25925863X

Firmado digitalmente
por JOSE AGUILERA
AVILA - DNI
25925863X
Fecha: 2023.06.09
03:33:31 +02'00'

H. Puebla de Zaragoza, 22 de junio de 2023



BUAP

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto la Comisión Revisora formada por la Dra. Irma Herrera Camacho, Dra. Isabel Martínez García, Dr. Rodrigo Erick Escartín Pérez, Dr. José Manuel Pérez Aguilar y el Dr. Jorge Manzanares Robles, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada **“Análisis *in silico* del complejo ligando-receptor de GPR55, su implicación en el Glóbo Pálido externo y en las conductas motoras de ratas hemiparkinsonianas”**, que presenta el alumno **M.C. Felipe Patricio Martínez** para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los seis días del mes de junio del año dos mil veintitrés.

ATENTAMENTE

Dra. Irma Herrera Camacho

Dra. Isabel Martínez García

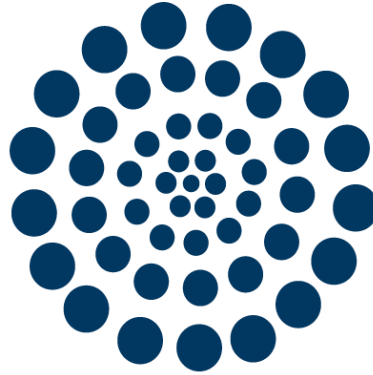
Dr. Rodrigo Erick Escartín Pérez

Dr. José Manuel Pérez Aguilar

JORGE|
MANZANAR
ES|ROBLES

Firmado digitalmente
por JORGE|
MANZANARES|ROBLES
Fecha: 2023.06.09
00:38:59 +02'00'

Dr. Jorge Manzanares Robles



CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

*El presente trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con el número de becario: **732793**, durante el periodo enero 2019 – diciembre 2022*



*Se aportaron apoyos por parte de la **Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado de la BUAP** a los programas VIEP otorgados al Dr. I. Daniel Limón: Proyectos VIEP-2020, VIEP-2021 y VIEP-2022 para el presupuesto parcial de la presente tesis.*



Al **Laboratorio de Neurofarmacología** de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP que me ha permitido crecer académicamente y también como persona a lo largo del Doctorado.

El trabajo que se realizó en la presente TESIS fue bajo la Dirección de:

Dr. Daniel Limón Pérez de León

Laboratorio de Neurofarmacología
Profesor- Investigador
Facultad de Ciencia Químicas-BUAP

Dr. José Aguilera Ávila

Investigador – Facultad de Medicina
Institut de Neurociències
Universitat Autònoma de Barcelona, España

UAB
Universitat Autònoma
de Barcelona



INc
Institut de
Neurociències



Facultad de Ciencias Químicas BUAP



Los experimentos *in silico* se realizaron en colaboración con el grupo de Trabajo del **Dr. José Manuel Pérez Aguilar** de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP y del **cDr. Eliud Morales Dávila** del Posgrado en Ciencias Químicas, área de Fisicoquímica - FCQ- BUAP

***A los animales utilizados en el presente trabajo, ya que sin ellos no
podríamos avanzar en la Ciencia y la Tecnología***



Los animales utilizados en la presente tesis fueron proporcionados por el **Bioterio “Claude Bernard”** de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, bajo la coordinación del **MVZ. MC. Francisco Ramos Collazo.**

“Producir un fármaco nuevo es un proceso largo y complejo en donde las pruebas en animales desempeñan un papel vital e importante”

The Nuffield Council on Bioethics

A LA COMISIÓN REVISORA DEL PRESENTE TRABAJO

Un agradecimiento especial por su apoyo en los comentarios,
correcciones y su dedicación para revisar la presente tesis.

Dra. Irma Herrera Camacho

Dra. Isabel Martínez García

Dr. José Manuel Pérez Aguilar

Dr. Rodrigo Erick Escartín Pérez

Dr. Jorge Manzanares Robles

Mi respeto y admiración hacia ustedes

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

Al comenzar a escribir estas líneas, con el silencio característico del laboratorio a partir de las 10:00 pm, no puedo dejar de sentir nostalgia por las veces que estuve trabajando en estas mismas circunstancias. Voltear y ver el camino recorrido en todo este tiempo, vienen a mi mente los recuerdos de las personas que estuvieron a mi lado en estos cuatro años, por lo que no puedo dejar de dar las gracias a todos ellos:

A Dios: Por ser mi fortaleza espiritual, por darme todo lo que tengo y valoro en esta vida. Tengo la convicción de saber que tú siempre has estado a mi lado a través de los años y en los momentos más difíciles. *Enséñanos de tal modo a contar nuestros días, que traigamos al corazón sabiduría* (Salmos 90:12).

A mi hermosa y amada Familia: **Daniela Donaji**, no ha sido fácil este camino, comenzamos nuestro matrimonio casi a la par del inicio del doctorado. Agradezco tu amor, tu paciencia, tus cuidados, tu comprensión en todo lo que demanda un trabajo doctoral, siempre resaltaré que eres una mujer excepcional. Ahora, al concluir este objetivo de mi vida profesional, no pudo decir que he terminado este trabajo sólo, es un trabajo que hemos hecho juntos. Sobre todo, porque existe un impulso que ahora detona nuestras ganas de seguir trabajando y superarnos: nuestros hijos, **Felipe Daniel** y **Liz Aleidy**. Gracias por darme felicidad y por convertir esas noches de cansancio a noches de alegría, a noches de esperanza, de saber que, al llegar a casa, sería recibido por las manos, los abrazos y las sonrisas más hermosas que pueden existir en este mundo para mí. ¡Los amo en sobremanera! *Dedico a ustedes esta tesis.*

A mis padres: **Felipe y Victorina**, por su amor incondicional y apoyo emocional, ya que ustedes fueron los primeros en impulsar mi vida académica, y sobre todo en alentarme para seguir constante en todo lo que hago desde mi niñez y juventud. Muchas gracias por su amor y cariño.

A mi hermano: **Francisco**, por haber sido siempre un ejemplo a seguir, por haber sido un pilar fuerte en mi vida y porque sé que siempre hemos estado en tus oraciones. A pesar de la distancia y las circunstancias, puedo contar con tu apoyo. Muchas gracias.

A los integrantes del Laboratorio de Neurofarmacología: Porque a pesar de que en ocasiones los escenarios no son siempre los mismos, sigue la misma esencia académica que debe existir en un grupo de trabajo de investigación. A los integrantes pre-pandemia que participaron en diferentes seminarios y que pudimos convivir: a Olivia, Patricia, Sonia, Israel, Lesli, Alan Axel. Un agradecimiento especial para **Guadalupe Remigio** y a **Nayeli Arana del Carmen**, ya que su ayuda fue importante para los experimentos de la presente tesis. A los actuales integrantes del Laboratorio (post-pandemia): Dulce Manuel, Elizabeth Martínez, Víctor Crisanto, Enoc Martínez, Edgar Macuil, Nadezhda Tamara, José María Carrasco, Steven Flores, Angélica Aguilar, Fernanda López, Elizabeth Machorro, Carolina de los Santos, Jhonatan David y Alondra Rueda. Gracias por sus observaciones y comentarios en cada uno de los seminarios.

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

Dr. Daniel Limón Pérez de León.

Mi agradecimiento especial para usted, ya que me dio la oportunidad de colaborar en su laboratorio y con su admirable grupo de trabajo. Así mismo, agradezco su confianza en mí para poder realizar mis estudios doctorales, por enseñarme lo más importante en la investigación, que es la observación y la reflexión de los resultados obtenidos. Agradezco infinitamente su apoyo, que en diferentes ocasiones ha sido incondicional, por sus enseñanzas que más allá de las disertaciones, me ha enseñado con los hechos. Admiro grandemente la forma de enseñar desde lo más básico, a lo más especializado, pero, sobre todo, siempre admiraré la calidad de ser humano que puede ser con todos los integrantes del laboratorio. Siempre tendré almacenada en mi memoria los gratos recuerdos que he pasado en el H. Laboratorio de Neurofarmacología. ¡Muchas gracias por su dirección, pero sobre todo por ser un gran amigo!

Dr. José Aguilera Ávila.

Agradezco infinitamente su disposición de poder trabajar y colaborar con usted. También agradezco sus constantes visitas al laboratorio de Neurofarmacología, que además de ser productivas, han sido muy amenas, y con calor fraterno. Así mismo, agradezco sus atenciones y revisiones para el presente trabajo, ya que siempre ha tenido el deseo de compartir su conocimiento y así poder crecer académicamente. Espero que en las siguientes colaboraciones podamos seguir trabajando en diferentes proyectos y podamos seguir compartiendo tiempo para trabajos y también, tiempos de calidad cada vez que venga a la ciudad de Puebla. ¡Se le estima mucho!

Dra. Aleidy Patricia Martínez.

Sobran las palabras para agradecerle todo lo que has hecho por mí, tanto en mi vida como en la investigación. Además de quererte mucho por ser la mejor hermana del mundo, he sabido respetarte y admirarte como la mujer de Ciencia que eres. Porque has sabido enfrentar las adversidades y salir de ellos con valentía y además con la mejor actitud. Gracias por las críticas constructivas que siempre tuviste en los seminarios, ya que siempre salía algo nuevo que pensar, reflexionar y quizás modificar del trabajo. Muchas gracias por los buenos momentos que pasamos juntos el Doc, tu y yo, siempre tendré esos momentos en mi corazón. ¡Eres y serás siempre un ejemplo a seguir en mi vida!

INDICE

Índice			
I.	INTRODUCCIÓN		1
	1.1	Generalidades en la estructura y función de los receptores acoplados a proteínas G	2
	1.1.1	GPCR huérfanos y su importancia como dianas farmacológicas novedosas	4
	1.2	Estructura y función del receptor GPR55	5
	1.2.1	Expresión y localización del receptor GPR55	6
	1.2.2	Farmacología y señalización del receptor GPR55	7
	1.3	Rol modulador del receptor GPR55 sobre los sistemas de neurotransmisión	11
	1.4	El circuito de los ganglios basales y su rol en los modelos Parkinsonianos	12
	1.4.1	Estructura y modulación del circuito de los ganglios basales	12
	1.4.2	El sistema de neurotransmisión GABAérgica y su rol en los modelos Parkinsonianos	14
	1.4.2.1	Generalidades de los modelos hemiparkinsonianos en roedores	15
	1.4.3	Modulación del sistema dopaminérgico sobre el GPe	17
	1.4.3.1	Alteraciones neurobiológicas del GPe en modelos parkinsonianos	18
II.	JUSTIFICACIÓN		21
III.	HIPÓTESIS		23
IV.	OBJETIVOS		23
	4.1	Objetivo General	23
	4.2	Objetivos Particulares	23
V.	MATERIALES Y MÉTODOS		25
	5.1	Diagramas de trabajo	25
	5.2	<i>Análisis in silico</i>	26
	5.2.1	Modelamiento por homología	26
	5.2.2	Identificación de superficie molecular	26
	5.2.3	<i>Docking molecular</i>	26
	5.3	Sujetos de experimentación	27
	5.4	Cirugía estereotáxica	27
	5.5	Administración de fármacos	28
	5.6	Modelos conductuales	28
	5.6.1	Conducta de giro	28
	5.6.2	Modelo de la escalera	29
	5.6.2.1	Asimetría motora	29
	5.6.2.2	Habilidades motoras finas	30
	5.7	Técnicas histológicas	31
	5.7.1	Evaluación morfológica por la Tinción de Nissl	31
	5.7.2	Determinación de la expresión de TH y GAD-67 por Inmunohistoquímica	31
	5.7.3	Determinación del receptor GPR55 por inmunofluorescencia	32
	5.7.4	Técnica para la cuantificación de imágenes por número de células positivas a TH	33
	5.6.5	Determinación de proteínas por el método del ácido bicinconínico	33
	5.8	Análisis estadístico	34

VI.	RESULTADOS	36
	6.1	El receptor GPR55 adopta tres sitios de unión con alto potencial farmacológico
	6.2	El receptor GPR55 y su interacción farmacológica LPI, CBD y CID160
	6.2.1	Interacciones del Lisofosfatidilinositol con el receptor GPR55
	6.2.2	Interacciones del CID16020046 con el receptor GPR55
	6.2.3	Interacciones del Cannabidiol con el receptor GPR55
	6.2.4	El Lisofosfatidilinositol, CID16020046 y Cannabidiol comparten el sitio de unión ortostérico de GPR55
	6.3	La activación y la inhibición del receptor GPR55 en el globo pálido externo mejora la asimetría motora en ratas hemiparkinsonianas
	6.4	La activación del receptor GPR55 en el globo pálido externo no modifica el déficit motor de ratas hemiparkinsonianas en el modelo de la escalera
	6.5	El antagonismo selectivo del receptor GPR55 mejora el comportamiento motor de ratas hemiparkinsonianas en el modelo de la escalera
	6.6	La administración intrapalidal de Cannabidiol mejora el comportamiento motor de ratas hemiparkinsonianas
	6.7	El agonismo del receptor GPR55 disminuye las habilidades motoras finas de ratas hemiparkinsonianas
	6.8	El antagonismo selectivo del receptor GPR55 mejora las habilidades motoras finas de ratas hemiparkinsonianas
	6.9	La administración intrapalidal de Cannabidiol mejora las habilidades motoras finas de ratas hemiparkinsonianas
	6.10	La administración de LPI, CBD o CID16020046 no altera la morfología del globo pálido de ratas hemiparkinsonianas
	6.11	La administración de LPI, CBD o CID16020046 no modifica la expresión de tirosina hidroxilasa en el cuerpo estriado y sustancia negra pars compacta de ratas hemiparkinsonianas
	6.12	La inyección intrapalidal de CBD o CID16020046 disminuye la expresión de GAD67 en el globo pálido externo y cuerpo estriado de ratas hemiparkinsonianas
	6.13	El lisofosfatidilinositol y el cannabindiol no modifican la expresión del receptor GPR55 en el estriado ipsilateral a la lesión
	6.14	El cannabindiol incrementa la expresión del receptor GPR55 en el globo pálido externo ipsilateral a la lesión
VII.	DISCUSIÓN	62
VIII	CONCLUSIONES	73
IX.	PERSPECTIVAS	75
X.	REFERENCIAS	77

RESUMEN

Se ha demostrado que el cannabidiol (CBD) tiene propiedades antiparkinsonianas y efectos neuromoduladores a nivel del SNC, posiblemente debido a la actividad pleiotrópica sobre diferentes dianas moleculares. Recientemente, el receptor GPR55 se ha convertido en un objetivo molecular del CBD. Por otra parte, el ARNm de GPR55 se expresa en el globo pálido externo (GPe) y el cuerpo estriado, que constituyen la vía indirecta del circuito de los ganglios basales (GB), por lo que se ha sugerido que su actividad está relacionada con la disfunción motora en estados parkinsonianos. Para estudiar las propiedades moleculares tanto del receptor como de sus ligandos, el presente trabajo tuvo como objetivo determinar a nivel *in silico* las propiedades moleculares de la interacción ligando-receptor y, por otra parte, estudiar a nivel *in vivo*, el efecto de la inyección intrapalidal de CBD y un antagonista selectivo de GPR55 (CID16020046) sobre la asimetría motora, las habilidades motoras finas y la expresión de GAD-67 en ratas hemiparkinsonianas. El modelo animal hemiparkinsoniano consistió en la inducción de una lesión en ratas macho de la cepa Wistar a través de la infusión del neurotóxico 6-hidroxidopamina (6-OHDA) en la vía nigro-estriatal por cirugía estereotáxica. Después de un período de veinte días, se realizó un segundo procedimiento quirúrgico para implantar una cánula guía en el GPe. Siete días después, se inyectó lisofosfatidilinositol (LPI), CBD o CID16020046 una vez al día durante tres días consecutivos (del día 28 al 30 después de la lesión). El comportamiento de giro inducido por anfetaminas se evaluó en los días 14 y 30 posteriores a la lesión. La prueba de la escalera y las habilidades motoras finas se evaluaron de la siguiente manera: las ratas se sometieron a un período de entrenamiento de diez días antes de la lesión por 6-OHDA; del día 15 al 19 post lesión se evaluaron las alteraciones de la motricidad en condiciones basales; y, del día 28 al 30 post lesión, se evaluaron los efectos farmacológicos de los fármacos administrados. Los resultados obtenidos muestran que a nivel *in silico*, las interacciones constantemente observadas en el *docking* molecular fueron las regiones aminoacídicas Lys167 y Glu98, además de observarse la interacción de los tres fármacos en el sitio ortostérico del receptor. A nivel *in vivo* se demostró que la administración de LPI o CBD generó menores niveles de asimetría motora en el comportamiento de giro de ratas hemiparkinsonianas. También se encontró que la inyección de CBD o CID16020046, pero no LPI, en las ratas hemiparkinsonianas generó un rendimiento significativamente superior en la prueba de la escalera, en términos del uso de la extremidad anterior contralateral a la lesión inducida por 6-OHDA, cuando se evaluó desde del día 28 al 30 post-lesión. También se observaron resultados similares para el desempeño superior de las habilidades motoras finas para pronación, agarre y supinación. Finalmente, se encontró que los niveles de inmunorreactividad para la enzima GAD-67 en el estriado y el GPe ipsilateral de las ratas inyectadas con CBD y CID16020046 disminuyeron, en contraste con las lesionadas con 6-OHDA.

ABSTRACT

Cannabidiol (CBD) presents antiparkinsonian properties and neuromodulatory effects, possibly due to the pleiotropic activity caused at multiple molecular targets. Recently, the GPR55 receptor has emerged as a molecular target of CBD. Interestingly, GPR55 mRNA is expressed in the external globus pallidus (GPe) and striatum, which constitute the indirect pathway of the basal ganglia (GB) circuit. Hence, it has been suggested that its activity is linked to motor dysfunction in Parkinson's disease (PD). In order to study the molecular properties of both the receptor and its ligands, the present work aimed to determine, at an *in silico* level, the molecular properties of the ligand-receptor interaction and, on the other hand, to study, at an *in vivo* level, to evaluate the effect of the intrapallidal injection of both CBD and a selective GPR55 antagonist (CID16020046) on motor asymmetry, fine motor skills, and GAD-67 expression in hemiparkinsonian rats. The hemiparkinsonian animal model applied involved the induction of a lesion in male Wistar rats via the infusion of the neurotoxin 6-hydroxydopamine (6-OHDA) into the medial forebrain bundle via stereotaxic surgery. After a period of twenty days, a second surgical procedure was performed to implant a guide cannula into the GPe. Seven days later, lysophosphatidylinositol (LPI), CBD, or CID16020046 were injected once a day for three consecutive days (from the 28th to the 30th day post-lesion). Amphetamine-induced turning behavior was evaluated on the 14th and 30th days post-injury. The staircase test and fine motor skills were evaluated as follows: the rats were subject to a ten-day training period prior to the 6-OHDA injury; from the 15th to the 19th days post-lesion, the motor skills alterations were evaluated under basal conditions; and, from the 28th to the 30th day post-lesion, the pharmacological effects of the drugs administered were evaluated. The results obtained show that at the *in silico* level, the interactions constantly observed in the molecular docking were the Lys167 and Glu98 amino acid regions, in addition to observing the interaction of the three drugs in the orthosteric site of the receptor. At the *in vivo* level, that the administration of LPI or CBD generated lower levels of motor asymmetry in the turning behavior of hemiparkinsonian rats. It was also found that the injection of CBD or CID16020046, but not LPI, in the hemiparkinsonian rats generated significantly superior performance in the staircase test, in terms of the use of the forelimb contralateral to the 6-OHDA-induced lesion, when evaluated from the 28th to the 30th day post-lesion. Similar results were also observed for superior fine motor skills performance for pronation, grasp, and supination. Finally, the immunoreactivity levels were found to decrease for the GAD-67 enzyme in the striatum and the ipsilateral GPe of the rats injected with CBD and CID16020046, in contrast with those lesioned with 6-OHDA. The results obtained suggest that the inhibitory effects of CBD and CID16020046 on GPR55 in the GPe could be related to GABAergic overactivation in hemiparkinsonism, thus opening new perspectives to explain, at a cellular level, the reversal of the motor impairment observed in PD models.

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades en la estructura y función de los receptores acoplados a proteínas G

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) constituyen a la superfamilia de receptores de membrana más abundantes de los organismos eucariotas. Su estructura está constituida por siete dominios transmembranales (7TM), unidos por tres bucles extracelulares (ECL1, ECL2 y ECL3) y tres bucles intracelulares (ICL1, ICL2 e ICL3), así como un dominio amino terminal con dirección al espacio extracelular y un dominio carboxilo terminal intracitoplásmico (Figura 1A). Los GPCR tienen gran relevancia en la medicina, debido a que participan tanto en procesos fisiológicos como patológicos; además, modulan señalizaciones extracelulares a través de las vías efectoras intracelulares por segundos mensajeros activados por las proteínas G heterotriméricas (Guo et al., 2022; Leysen et al., 2021). Las proteínas G están compuestas por tres subunidades (α - β - γ), de tal manera que cuando el ligando se une con el GPCR, induce un cambio conformacional tanto en el receptor como en la proteína G. La modificación en la conformación del complejo heterotrimérico se debe al dominio GTPasa y al dominio helicoidal que constituye la proteína G. Por lo tanto, cuando el receptor es activado, se lleva a cabo el intercambio molecular de GDP a GTP que produce la separación entre las subunidades G_α y $G_{\beta\gamma}$. Sin embargo, una vez que se hidroliza GTP a GDP, la subunidad alfa se reagrupa con el dímero $G_{\beta\gamma}$, retornando a su estado inactivo inicial α - β - γ (Figura 1B) (Oldham and Hamm, 2008; Zhang et al., 2015).

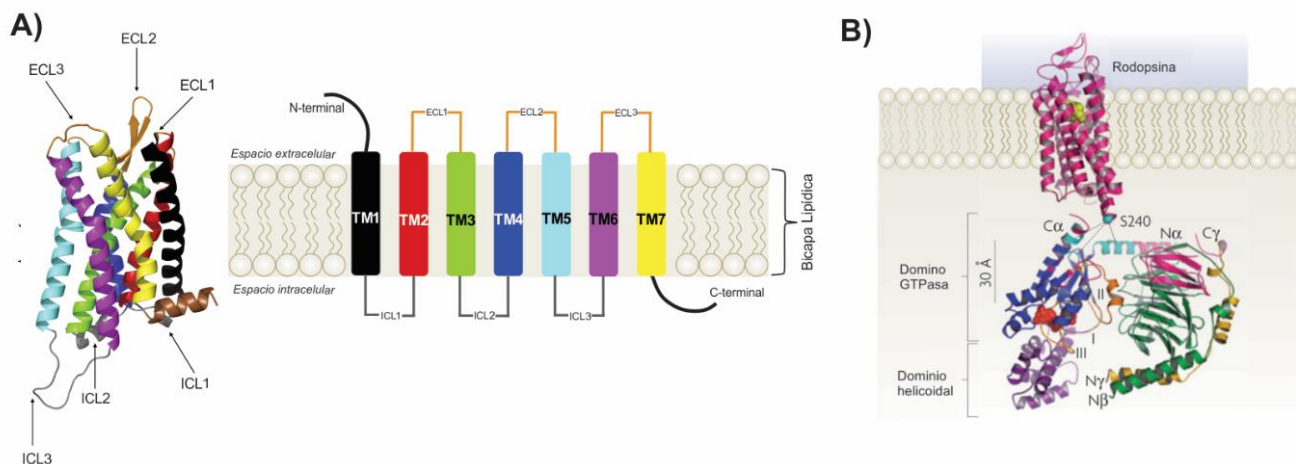


Figura 1. Esquema generalizado de los GPCR. A) Conectividad de los bucles intracelulares (ICL) y extracelulares (ECL) entre los 7 dominios transmembranales (7TM). B) Modelo tridimensional del receptor de rodopsina, cuando se activa, GDP (esferas rojas) pasa a GTP para desanclarse de Ser240 (se encuentra como sitio de unión entre ICL3 y la proteína G) y de $G_{\beta\gamma}$ (N_α y C_γ). Tomado y modificado de Oldham y Hamm, 2008.

Hasta la fecha se han caracterizado 21 isoformas de la subunidad $G\alpha$ codificadas por 16 diferentes genes, es así que se pueden clasificar en cuatro grupos conocidos de la siguiente manera: $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q11}$, $G\alpha_{12/13}$ (Downes and Gautam, 1999; McIntire, 2009). Estos grupos se diferencian principalmente por su actividad, ya que la subunidad $G\alpha_s$ tiene la función de activar a la enzima Adenilato ciclasa (AC) y, por el contrario, la subunidad $G\alpha_{i/o}$, promueve su inhibición. La estimulación de la AC induce el incremento de AMPc y, posteriormente, esta molécula interacciona con la proteína cinasa A (PKA) para activar factores de transcripción como el elemento de respuesta a AMPc (CREB) (Wettschureck and Offermanns, 2005). Por otra parte, la proteína $G\alpha_{q11}$, suscita otra vía de señalización, que consiste en activar a la enzima fosfolipasa C (PLC) que hidroliza al fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP_2) a inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) así como diacilglicerol (DAG). El IP_3 induce el incremento de Ca^{2+} intracelular del retículo endoplásmico ($[Ca^{2+}]_i$; RE) y, en cuanto al DAG, activa a la proteína cinasa C (PKC) que, además estimula a las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Kamoto et al., 2015). Por último, las subunidades $G\alpha_{12/13}$ se caracterizan por presentar como mediadores a las proteínas asociadas a Rho (ROCK) que son cinasas serina/treonina y son objetivos río debajo de las pequeñas GTPasas RhoA, RhoB y RhoC (Schmandke and Strittmatter, 2007) (Figura 2).

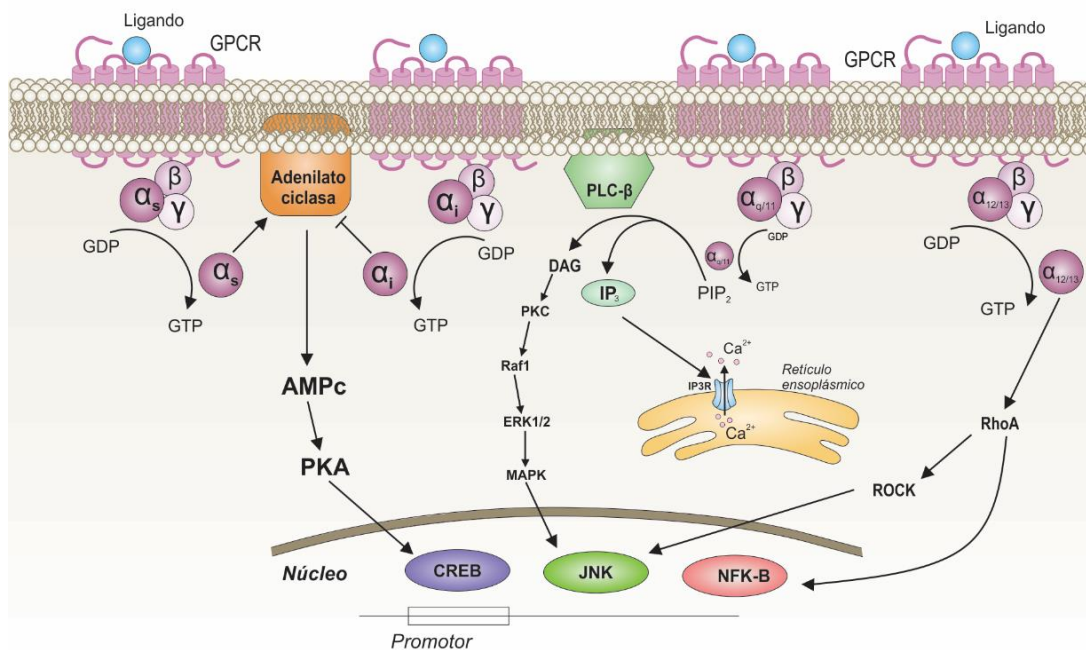


Figura 2. Vías de señalización que modulan las subunidades $G\alpha$ de los GPCR. Las subunidades $G\alpha_s$ y $G\alpha_i$ tienen influencia sobre la AC para la síntesis de AMPc, la subunidad $G\alpha_{q11}$ modula las $[Ca^{2+}]_i$ del RE, y por último la subunidad $G\alpha_{12/13}$, modula las pequeñas GTPasas y la señalización ROCK.

Interesantemente, se ha estimado que el 36% de los fármacos comercializados a nivel mundial tienen como objetivos moleculares a los GPCR, de modo que es necesario estudiar tanto los aspectos estructurales como funcionales de los receptores; así mismo, identificar sus ligandos endógenos, con el fin de proponer innovaciones biotecnológicas y farmacológicas para la medicina humana (Chung et al., 2008; Tang et al., 2012; Yoshida et al., 2012).

1.1.1. GPCR huérfanos y su importancia como dianas farmacológicas novedosas

Los GPCR son los objetivos farmacológicos más sobresalientes en el estudio de la medicina moderna. Sin embargo, existen más de 140 GPCR que siguen sin caracterizar a sus ligandos endógenos y, por consiguiente, se desconocen tanto sus mecanismos biológicos como moleculares (Levoye et al., 2006; Tang et al., 2012). Después de descubrir el genoma humano, muchos investigadores identificaron nuevos GPCR, pero sin determinar al endógeno. De este modo la IUPHAR (*International Union of Basic and Clinical Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification*) catalogó a un grupo de receptores como huérfanos (Davenport and Harmor, 2013). Actualmente, se espera que los GPCR huérfanos proporcionen nuevos objetivos terapéuticos que interaccionen de manera más selectiva con sus ligandos y, por consiguiente, resulten con menos efectos secundarios (Ngo et al., 2016). Además, estos receptores pueden proporcionar nueva información sobre vías de señalización que actualmente se desconocen y, por otra parte, impulsaría a buscar nuevas estrategias de diseño de fármacos (Salon et al., 2011; Shore and Reggio, 2015). Debido a que existen varios GPCR con la categoría de receptor huérfano, es necesario estudiar y focalizar aquellos receptores que puedan tener un mayor impacto sobre la fisiología de sistemas y órganos corporales de manera particular. Recientemente se ha estudiado el rol del receptor GPR55 en diferentes procesos fisiopatológicos que afectan la salud humana, tales como el cáncer, la inflamación, la nocicepción, la obesidad, enfermedades cardíacas, óseas, gastrointestinales y neuropsiquiátricas (Alhouayek et al., 2018; Chiurchiù et al., 2015; Dörnyei et al., 2023). A pesar de que el receptor GPR55 sigue clasificado como un receptor huérfano, existen varios reportes que impulsan retirar la

característica como “huérfano” (*deorphanization*) y clasificarlo dentro de un sistema apropiado (Marichal-Cancino et al., 2017). El receptor GPR55 participa de manera estrecha con el sistema endocannabinoide, e inclusive, los primeros estudios publicados, presentaron al receptor GPR55 como el receptor cannabinoide tipo 3 (CB3) (Moriconi et al., 2010; Yang et al., 2016).

1.2. Estructura y función del receptor GPR55

El receptor GPR55 es un GPCR que pertenece al grupo δ de la familia de las rodopsinas o, también llamada clase A de los GPCR (Fredriksson et al., 2003). Está constituido por 319 aminoácidos en el ser humano, 327 aminoácidos en el ratón y 336 aminoácidos en la rata, de tal manera que las tres especies comparten secuencias ortólogas (Baker et al., 2006) (Figura 3A). Otra característica estructural del receptor, son las secuencias consenso para la glicosilación y los sitios de fosforilación para la PKA (Henstridge et al., 2011). Además, el receptor tiene cuatro residuos Cys (Cys10, Cys94, Cys168 y Cys260) para formar dos puentes disulfuro en la superficie del receptor (Kotsikorou et al., 2013) (Figura 3B). Inicialmente se había catalogado al receptor GPR55 como un integrante de la familia de receptores purinérgicos o de quimiocinas, debido a que existe un alto porcentaje de identidad con otros receptores como el LPAR6 (29%), LPAR4 (30%), GPR35 (27%) y CCR4 (23%) (Sawzdargo et al., 1999). Posteriormente se realizó un perfil farmacológico del receptor y se propuso por primera vez, a GPR55 como un nuevo integrante de los receptores a cannabinoides (Ryberg et al., 2007).

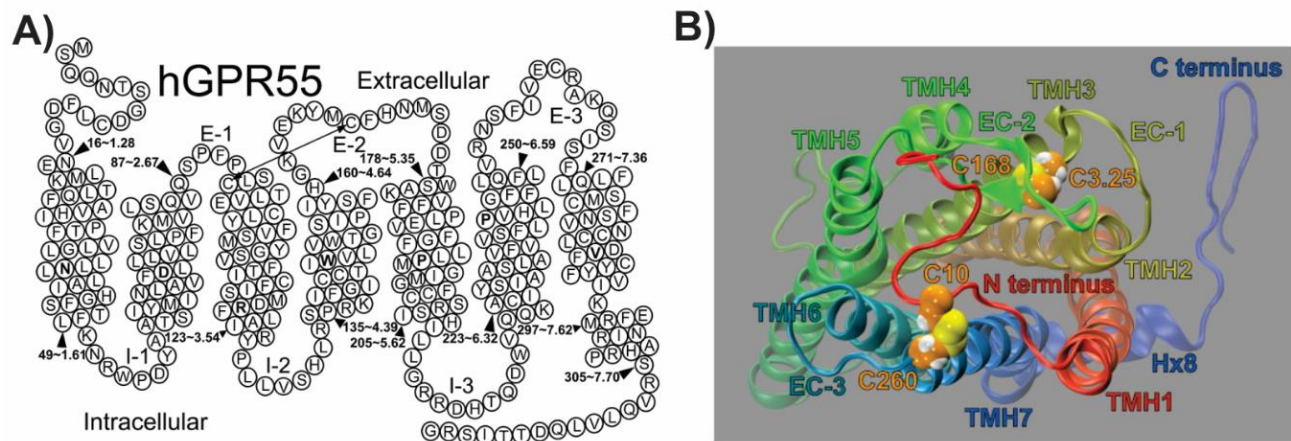


Figura 3. Estructura bidimensional y tridimensional del receptor GPR55. A) Secuencia aminoacídica del receptor GPR55 se forman los 7TM, 3 bucles intracelulares y 3 extracelulares. La flecha indica los dos residuos de Cys que forman uno de los puentes disulfuro. B) Representación tridimensional del receptor GPR55, se observan los puentes disulfuro en C10-C260 y C168 y C94 (esferas color anaranjado). Tomado de Sharir y Abood, 2010; Kotsikorou et al., 2013.

Estudios *in silico* han evidenciado que el receptor GPR55 comparte un bajo porcentaje de identidad con los receptores CB1 (13.5%) y CB2 (14.4%) (Baker et al., 2006). De la misma manera y, por medio de herramientas computacionales, se analizaron las bases de datos de los tres GPCR y posteriormente, se construyeron huellas digitales moleculares (*functional fingerprint*). Los resultados de este análisis mostraron la ausencia de las secuencias aminoacídicas homólogas en GPR55 respecto a los receptores cannabinoides CB1 y CB2, que son característicos en el bolsillo de unión a cannabinoides (Petitet et al., 2006).

1.2.1. Expresión y localización del receptor GPR55

Los datos anteriores dieron la pauta para proponer que el receptor GPR55 no podía ser integrado a la familia de los receptores cannabinoides, esto es por la baja identidad del receptor GPR55 con los receptores CB1 y CB2. Sin embargo, se ha evidenciado también que el patrón de expresión del ARNm del receptor GPR55 es muy similar que la del CB1, pero de 8-10 veces menor (Ryberg et al., 2007) (Figura 4A). Dado que el receptor CB1 es el GPCR más abundante en el SNC y, además tiene un rol importante en la regulación de los sistemas de neurotransmisión, es probable que el receptor GPR55 pueda ejercer mecanismos similares o compensatorios en algunas regiones corporales y, además, pueda tener una influencia o participación en el sistema endocannabinoide (Cristino et al., 2020).

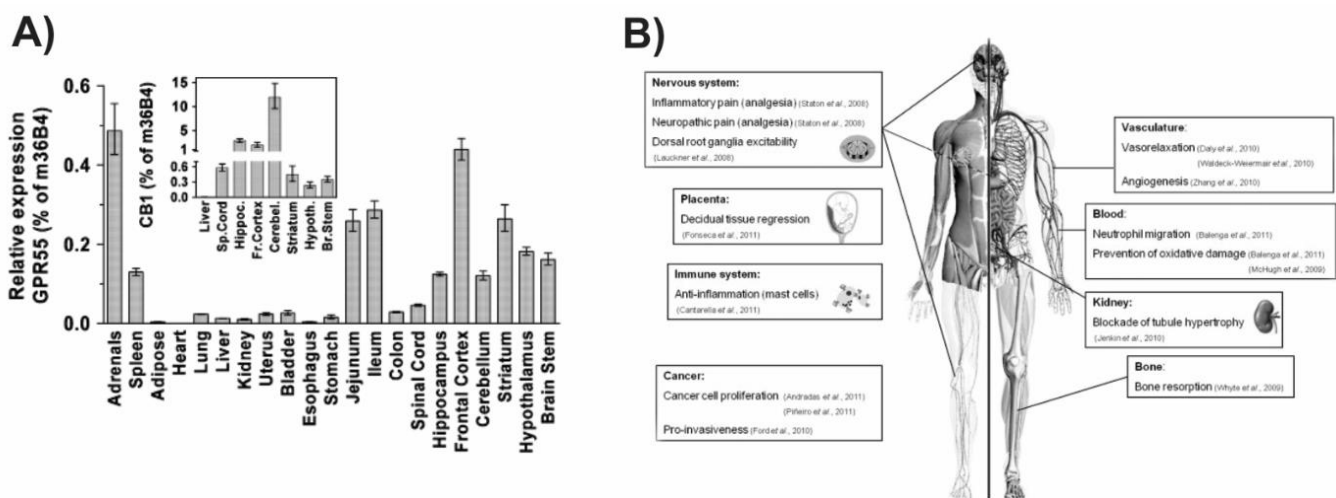


Figura 4. Expresión y localización del receptor GPR55. A) Niveles de expresión del ARNm de GPR55 en diferentes órganos de ratón, en comparación con el ARNm del receptor CB1, obsérvese que CB1 sobrepasa de 8-10 veces más a GPR55. B) Probables estrategias de abordaje farmacológico para diferentes patologías en el organismo del ser humano. Tomado de Ryberg et al., 2007; Henstridge et al., 2011.

Los primeros hallazgos confirmaron la expresión del ARNm del receptor GPR55 en el cerebro humano, principalmente en el caudado-putamen (Sawzdargo et al., 1999). Posteriormente, se evidenció su localización en otras regiones cerebrales como el núcleo *accumbens*, el hipocampo, el hipotálamo y el tronco encefálico. Así mismo, este receptor podría expresarse en algunos órganos periféricos de los mamíferos, tales como estómago, el intestino, el bazo, las células mononucleares de sangre periférica y la médula ósea (Figura 4B) (Henstridge et al., 2011; Ryberg et al., 2007).

1.2.2. Farmacología y señalización del receptor GPR55

Debido a que se desconocía el endógeno del receptor GPR55, se realizó un *screening* con diferentes lípidos de membrana que pudiesen activar al receptor GPR55. A través de la técnica de Western blot se cuantificó la intensidad de las bandas que fueron positivas a ERK total y se midió el *ratio* de ERK y fosfo-ERK. De todos los lípidos, se observó que sólo el lisofosfatidilinositol (LPI) activó a fosfo-ERK de las células HEK293 que expresaban al receptor GPR55, de tal manera que se propuso, como posible ligando endógeno de GPR55 al LPI (Oka et al., 2007) (Figura 5). El LPI es un lisofosfolípido de membrana que, inicialmente la literatura limitaba su función únicamente sobre las propiedades mecánicas de la membrana celular. Sin embargo, ahora se sabe que los lisofosfolípidos cumplen una función importante como lípidos bioactivos, por su acción como ligantes en una amplia diversidad de receptores huérfanos como del receptor GPR55 (Alhouayek et al., 2018).

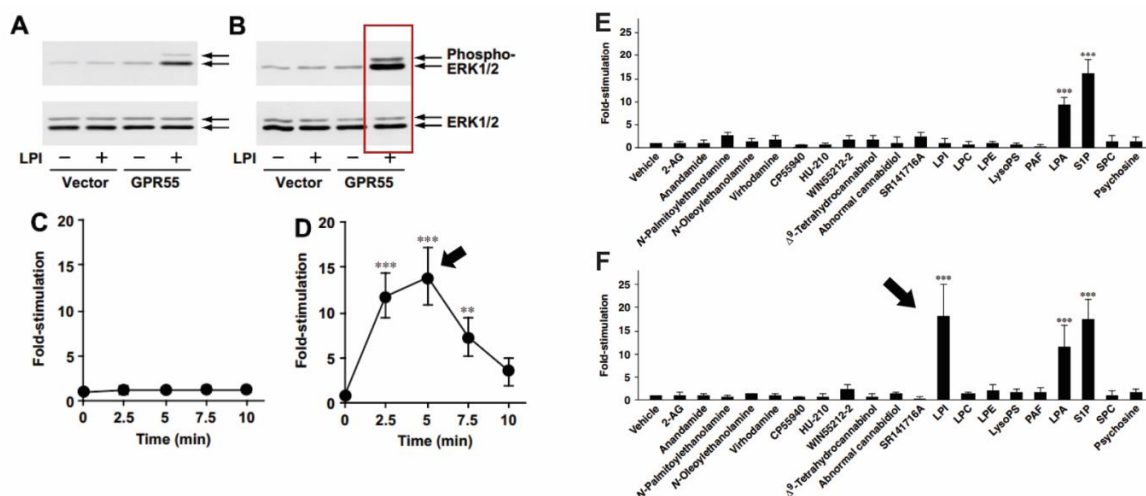


Figura 5. Activación del receptor GPR55 por LPI. A) Células HK293 con expresión de GPR55 de manera transitoria y B) Células HEK293 con expresión de GPR55 de manera estable. C) y D) estimulación de GPR55 con LPI [1 μ M]. E) Cultivo celular que no expresa GPR55 (vector), F) cultivo celular que expresa de manera estable a GPR55. Obsérvese que LPI es la única estructura que activa a GPR55. Tomado de Oka et al., 2007.

Los estudios realizados con una variedad de especies de LPI (1-palmitoil LPI, 1-esteroil LPI, 1-oleoil LPI y 2-araquidonil LPI) mostraron un incremento de manera dosis-dependiente en la fosforilación de ERK, del $[Ca^{2+}]_i$ RE y del estímulo de la unión de $[^{35}S]GTP\gamma S$, a una CE_{50} de 30 nM en células HEK293 que expresaron al receptor GPR55. (Oka et al., 2009). Se han reportado resultados contradictorios del receptor GPR55, a nivel farmacológico, especialmente cuando se utilizan agonistas y antagonistas cannabinoides (Ross, 2009). Se utilizó la técnica de unión de $[^{35}S]GTP\gamma S$ para estudiar el análisis funcional de las pequeñas GTPasas y, mostraron los efectos celulares de GPR55 cuando se utilizaron agonistas cannabinoides en células HEK293 transfectadas con hGPR55 (Ryberg et al., 2007) (Tabla 1).

El endocannabinoide 2-araquidonil glicerol (2-AG), la virodamina, el noladin éter, la palmitoiletanolamida (PEA), y la oleiletanolamida (OEA) activaron al receptor a concentraciones nanomolares. Igualmente, el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) y sus análogos el CP55940, el HU210, O-1602, así como el Cannabidiol anormal (abn-CBD) estimularon la unión de $[^{35}S]GTP\gamma S$; se observó que el agonista inverso de CB1, el AM251, actuó como agonista de GPR55. Interesantemente, el Cannabidiol (CBD) antagonizó los efectos del receptor por el agonismo de CP55940 y de anandamida (AEA) con una IC_{50} de 440 nM (Ryberg et al., 2007). Por otra parte, los cannabinoides sintéticos O-1602 [1.4 nM] y abn-CBD [2.5 nM] estimularon la unión de $[^{35}S]GTP\gamma S$ en células HEK293 transfectadas con GPR55 (Johns et al., 2007). En contraste, Oka y colaboradores no encontraron ningún efecto con 2-AG, AEA, PEA, OEA, virodamina, CP55940, HU-210, THC, abn-CBD y SR141716-A (rimonabant) (Oka et al., 2007). Posteriormente, se reportó que a concentraciones [3-5 μM] de THC, AEA y la meta-AEA y el agonista de CB2, el JWH-015, incrementaron las reservas $[Ca^{2+}]_i$ RE en células HEK293 transfectadas con GPR55 de ratón (Lauckner et al., 2008) (Tabla 1).

Por otra parte, se ha propuesto que la vía de señalización del receptor GPR55 está íntimamente relacionada con los agonistas utilizados (lisofosfolípidos o cannabinoides) y que probablemente podría ser explicado por un agonismo sesgado del GPCR. (Laprairie et al., 2017; Violin et al., 2014). Se evidenció que las subunidades de la proteína G, $G\alpha_{12/13}$ del receptor GPR55 fueron activados cuando se administró un agonista cannabinoide.

Estas subunidades fueron las responsables de la activación de [³⁵S]GTPγS provocada por la administración del agonista O-1602 o AEA a [1μM]. La vía de señalización fue amplificada por la activación de RhoA, así como la activación de las proteínas rac1, y cdc42; de tal manera que, el efecto provocado por estos agonistas cannabinoides fue antagonizado por el fitocannabinoide CBD a [10 μM] (Ryberg et al., 2007).

Tabla 1. Ligandos que promueven la activación o la inhibición del receptor GPR55					
Ligando	Cultivo celular	Efecto celular	Actividad agonista/antagonista	EC₅₀ / IC₅₀	Referencia
LPI	hGPR55-HEK293	↑ [³⁵ S]GTPγS	Agonista	No reportado	Oka et al., 2007
		↑ [Ca ²⁺] _i		0.05 μM	Henstridge et al., 2010
		↑ Fosfo ERK		0.074–1 μM	Anavi-Goffer et al., 2012; 2016
AEA	hGPR55-HEK293	↑ [³⁵ S]GTPγS	Agonista	18 nM	Ryberg et al., 2007
		[Ca ²⁺] _i	-	-	Henstridge et al., 2009
PEA	hGPR55-HEK293	↑ [³⁵ S]GTPγS	Agonista	4 nM	Ryberg et al., 2007
		Fosfo ERK	-	-	Oka et al., 2007
Virodamina	hGPR55-U2OS	↑ β-arrestina	Agonista	6.57 μM	Sharir et al., 2012
	hGPR55-HEK293	↑ [³⁵ S]GTPγS		12 nM	Ryberg et al., 2007
O-1602	hGPR55-HEK293	[Ca ²⁺] _i	-	-	Oka et al., 2009
		↑ [³⁵ S]GTPγS	Agonista	1.4 - 13 nM	Ryberg et al., 2007
CBD	hGPR55-HEK293	↓ [³⁵ S]GTPγS	Agonista inverso	354 nM	Ryberg et al., 2007
SR141716A	hGPR55-U2OS	↑ β-arrestina	Agonista	3.9 μM	Kapur et al., 2009
	hGPR55-HEK293	↑ [Ca ²⁺] _i		1.14 μM	Henstridge et al., 2010
		↑ Fosfo ERK		0.64 μM	Henstridge et al., 2010
AM251	hGPR55-U2OS	↑ β-arrestina	Agonista	9.6 μM	Kapur et al., 2009
	hGPR55-HEK293	↑ β-arrestina		2.7 – 3.1 μM	Yin et al., 2009
		↑ [Ca ²⁺] _i		0.63 μM	Henstridge et al., 2009; 2010
		↑ Fosfo ERK		0.54 μM	Henstridge et al., 2010
CID16020046	hGPR55-HEK293	[Ca ²⁺] _i	Antagonista	IC ₅₀ = 0.21 μM vs LPI	Kargl et al., 2013
		↓NFAT		IC ₅₀ = 0.48 μM vs LPI	Kargl et al., 2013
		Fosfo ERK		No reportado (vs LPI)	Kargl et al., 2013
ML193	hGPR55-U2OS	Fosfo ERK	Antagonista	IC ₅₀ = 0.2 μM vs LPI	Kotsikorou et al., 2013

Por lo tanto, estos hallazgos muestran que el CBD podría cumplir una función importante en la modulación del receptor GPR55 y otros receptores cannabinoides, debido a su actividad pleiotrópica (Junior et al., 2020). Otros estudios indicaron que el LPI, el rimonabant y el AM251 provocaron la liberación de Ca^{2+} intracelular a través de las subunidades de la proteína $\text{G}\alpha_{12}$, $\text{G}\alpha_{13}$ y RhoA en células HEK293 transfectadas con hGPR55 (Henstridge et al., 2009). Sin embargo, se demostró que la activación de la subunidad $\text{G}\alpha_q$, era dependiente de la activación de la proteína RhoA, al administrar THC [5 μM] (Lauckner et al., 2008).

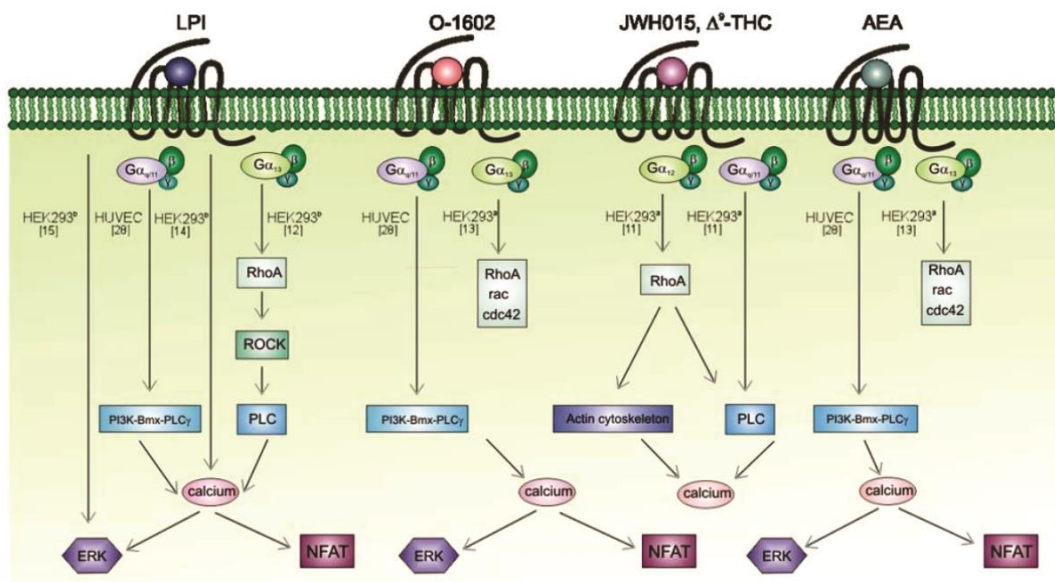


Figura 6. Vía de señalización de GPR55 estimulada por LPI y cannabinoides. Se representa el esquema de la vía de señalización que pueden ser activadas por las subunidades de la proteína $\text{G}\alpha_{12/13}$ y $\text{G}\alpha_q$. Se fosforila ERK y ROCK, se liberan las reservas de Ca^{2+} intracelular por PLC y PI3K. Tomado de Moriconi et al., 2010.

Posteriormente se sustentó aún más la idea de que el LPI es el agonista endógeno de GPR55, esto se evidenció al utilizar LPI a concentraciones de [3 μM] en células HEK293 y se evidenció la activación de β -arrestina y, en consecuencia, la internalización del receptor, además de promoverse la fosforilación de PKC- β II y de ERK 1/2 (Kapur et al., 2009). A pesar de las evidencias del LPI como agonista endógeno de GPR55, el receptor sigue clasificado como huérfano (Davenport et al., 2013), esto es por los hallazgos contradictorios en la compleja farmacología del receptor GPR55 y la insuficiente información de estudios experimentales a nivel in vivo (Alhouayek et al., 2018). En resumen, los datos mostrados previamente indicaron que, las vías de

señalización río abajo de GPR55 promueven la liberación de $[Ca^{2+}]_i$, la fosforilación de ERK y ROCK, la activación de RhoA, cdc42, y rac1, así como los factores de transcripción, NFAT, NF κ B y CREB (Figura 6). Por lo tanto, las vías de señalización activadas por GPR55 podrían tener efectos, en el SNC y que podrían estar participando sobre los sistemas de neurotransmisión.

1.3. Rol modulador del receptor GPR55 sobre los sistemas de neurotransmisión

Debido a que el receptor GPR55 se expresa altamente en el SNC del ser humano, también se ha documentado la expresión relativa del ARNm de GPR55 en cerebros de rata por qPCR. Diferentes reportes determinaron altos niveles en la corteza frontal (CtxF), el cuerpo estriado, hipocampo, hipotálamo y cerebelo (Henstridge et al., 2011; Ryberg et al., 2007; Wu et al., 2013). La expresión del receptor en dichos núcleos cerebrales podría estar asociada con diferentes procesos fisiológicos y conductuales como, el aprendizaje y la memoria (cuerpo estriado, hipocampo), la recompensa y las emociones (sistema límbico), el metabolismo (hipotálamo), el control sensorial y las funciones cognitivas (Corteza frontal), y el control motor (estriado y cerebelo) (Marichal-Cancino et al., 2017) (Figura 7A).

El rol del receptor GPR55 en la fisiología del SNC ha despertado interés en los últimos años, debido a sus diversos efectos neuroquímicos en áreas cognitivas, emotivas y motoras. Hallazgos recientes en cortes de hipocampo evidencian que la activación del receptor promueve la liberación neurotransmisores (Sylantsev et al., 2013), afecta la transmisión GABAérgica (Musella et al., 2017), la actividad dopaminérgica y la plasticidad sináptica en roedores (Hurst et al., 2017). Sin embargo, los experimentos conductuales con ratones *knockout* para GPR55 no afectó el aprendizaje y la memoria condicionada al miedo, las habilidades motoras gruesas y la ansiedad, pero si se observó un deterioro en la coordinación motora (Wu et al., 2013). Si bien, la expresión del ARNm de GPR55 en el cuerpo estriado, así como las alteraciones observadas en ratones *knockout*, sugiere un papel importante en la conducta motora. Recientemente se demostró la expresión del receptor en el circuito de los ganglios basales (GB) de ratón por hibridación *in situ* (ISH). La evaluación cualitativa de la ISH demostró la presencia del ARNm para GPR55 en el globo pálido externo (GPe) y el núcleo subtalámico (NST), así como en la corteza, el

estriado y la *sustancia nigra pars compacta* (SNpc), donde la señal fue más intensa que en la *sustancia nigra pars reticulada* (SNpr) (Celorrio et al., 2017) (Figura 7B). Las evidencias de la expresión del receptor GPR55 en el circuito de los GB proponen su participación en la modulación del movimiento voluntario.

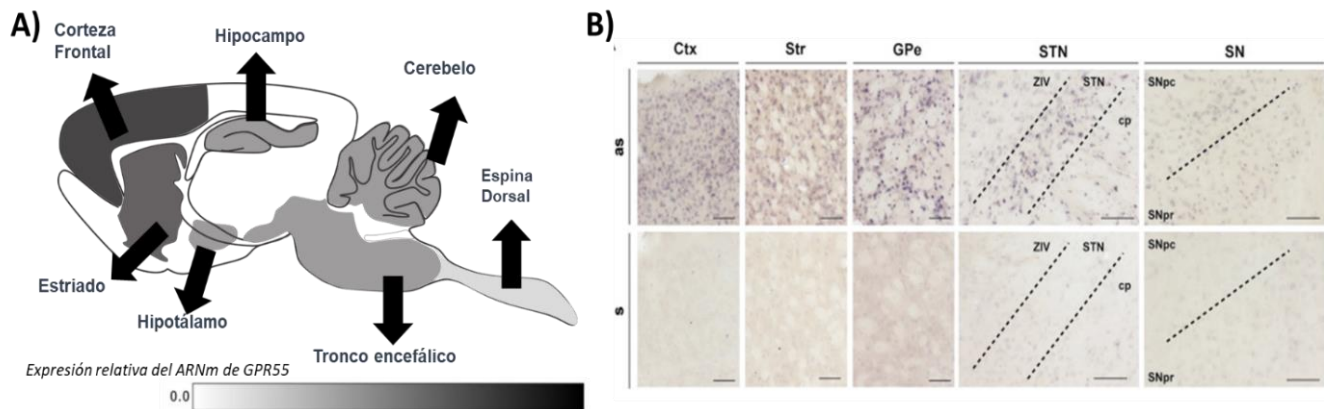


Figura 7. Patrones de expresión del ARNm de GPR55 en el cerebro murino. A) Se representa de manera esquemática la distribución del receptor GPR55 en corteza, estriado, hipocampo y cerebelo como regiones con mayor distribución. B) Se muestra la expresión del ARNm en los núcleos de los GB por la técnica de hibridación *in situ* con mayor distribución en GPe, STN y estriado (Str) (Tomado y modificado de Marichal-Cancino et al., 2017; Celorrio et al., 2017).

1.4. El Circuito de los ganglios basales y su rol en los modelos Parkinsonianos

1.4.1. Estructura y modulación del circuito de los ganglios basales

Los ganglios basales (GB) son núcleos subcorticales que promueven un circuito paralelo y parcialmente cerrado. Por lo tanto, el flujo de la información neuronal promueve la iniciación y la ejecución de los movimientos voluntarios (Klaus et al., 2019; Lanciego et al., 2012). Los núcleos de los GB han sido clasificados en i) núcleos de entrada, ii) núcleos de salida y iii) núcleos intrínsecos. Los núcleos de entrada son aquellas estructuras que reciben información procedente de diferentes fuentes, principalmente de origen cortical, talámico y nigral; el núcleo estriado es considerado el principal núcleo de entrada de la información cortical sensorio-motor. Los núcleos de salida son aquellas estructuras que envían información de los ganglios basales al tálamo y consisten en el segmento interno del globo pálido (GPi) y la SNpr. Por último, los núcleos intrínsecos como el segmento externo del globo pálido (GPe), el núcleo subtalámico (NST) y la SNpc se localizan entre los núcleos de entrada y de salida en el relé de la información (Albin et al., 1989; Groenewegen, 2003; Lanciego et al., 2012) (Figura 4A).

Las neuronas del cuerpo estriado son denominadas neuronas espinosas medianas (NEM) y son de naturaleza GABAérgica. Dichas neuronas integran la información procedente de las aferencias corticales y, envían la información procesada a los núcleos de salida (GPi/SNpr) de los GB, a través de las proyecciones estriado-palidal (vía indirecta) y las proyecciones estriado-nigral (vía directa) (Fieblinger, 2021; Yelnik, 2002) (Figura 8A). La vía estriado-palidal modula la actividad glutamamtérgica del NST, por lo que el tono glutamatérgico estimula al GPi/SNpr. Sin embargo, la excitación de los núcleos de salida es modulada por la vía directa de los GB con la liberación de GABA, para inhibir la excitación glutamatérgica proveniente del NST (Bolam et al., 2000; Fieblinger, 2021). Ambas vías son esenciales para la ejecución del movimiento, sin embargo, es necesaria la participación de neuromoduladores para la regulación de la entrada de información cortical.

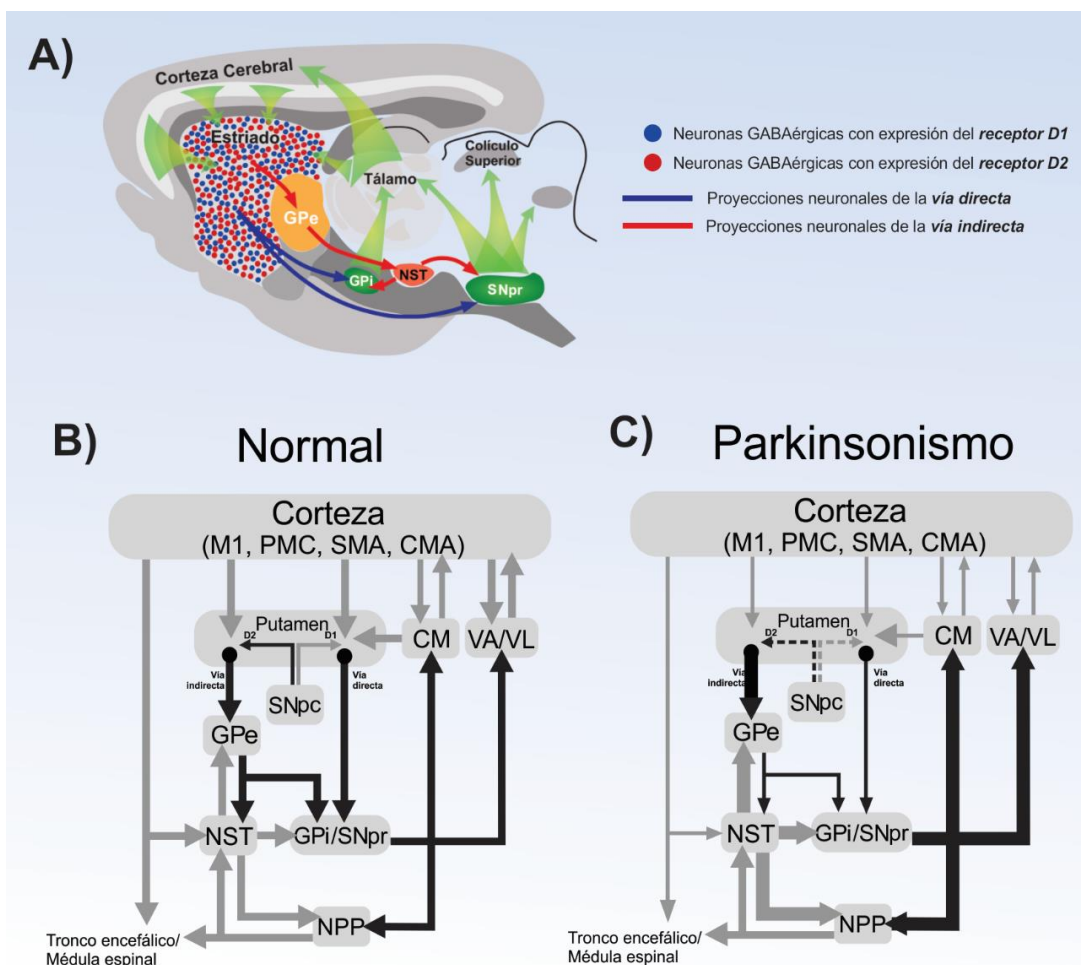


Figura 8. Modulación del circuito de los ganglios basales. A) Se representa de manera esquemática el corte sagital del encéfalo de ratas con las principales vías directa e indirecta. B) Modelo clásico del circuito de los GB de proyecciones GABAérgicas (líneas grises) y glutamatérgicas (líneas negras) C) Alteración de la actividad GABAérgica y glutamatérgica. (Tomado de Galván y Wichmann, 2008).

1.4.2. El sistema de neurotransmisión GABAérgica y su rol en los modelos Parkinsonianos

Puesto que las NEM del estriado son neuronas GABAérgicas, y que sus aferentes glutamatérgicas provienen de la corteza (vía cortico-estriatal), y las aferentes dopaminérgicas de la SNpc (vía nigro-estriatal); se sugiere que la actividad iniciada en las áreas motoras corticales proyecta sobre las NEM que originan la vía directa e indirecta de los GB y además, son moduladas por las terminales dopaminérgicas (Gerfen and Surmeier, 2011; Huerta-Ocampo et al., 2014). Por lo tanto, las interacciones sobre estas dos vías pueden ser útiles para diferentes movimientos individuales como la amplitud o la velocidad de los movimientos, facilitar el movimiento y suprimir el movimiento no deseado (Turner and Desmurget, 2010). Además, de estas funciones, los GB tienen diferentes roles sobre la conducta motora, tal es el caso de la planeación del movimiento voluntario, así como el aprendizaje motor de tipo procedimental y, el aprendizaje de secuencias de acciones, que está relacionada con la iniciación, la ejecución, y la orientación de los movimientos (Doyon et al., 2009; Kim and Hikosaka, 2015).

El modelo clásico del circuito de los GB propuesto por Albin y colaboradores propone que la activación de la vía estriado-nigral facilita el movimiento, específicamente por la activación del receptor D1 de tipo dopaminérgico (Albin et al., 1989). Por otra parte, la vía estriado-palidal inhibe el movimiento por la activación del receptor D2. Es así que las NEM del estriado que expresan los receptores dopaminérgicos, modulan la actividad GABAérgica (Gerfen and Surmeier, 2011). Además, se ha evidenciado que existen otros factores distintos a la actividad tónica, que pueden influir sobre la liberación de GABA de las terminales GABAérgicas. Tal es el caso de la densidad, los tipos y la localización de los receptores GABA, la cascada de eventos bioquímicos provocados por la activación de los receptores, la recaptura de GABA y, la actividad eléctrica mediada por la transmisión GABAérgica (Moldavan et al., 2017; Łątka et al., 2020).

El Parkinsonismo es un conjunto de discapacidades físicas de tipo motor que incluyen bradicinesia o acinesia, rigidez muscular y temblor en reposo (Galvan and Wichmann, 2008; Keener and Bordelon, 2016). Estas manifestaciones son el resultado de la degeneración de las neuronas dopaminérgicas o la disminución de las concentraciones de dopamina predominante de la vía nigro-estriatal (Zhang et al., 2018).

Es necesario enfatizar que no sólo el cuerpo estriado recibe proyecciones y terminales dopaminérgicas, así mismo la mayoría de los núcleos de los GB podría recibir colaterales dopaminérgicas (Rommelfanger and Wichmann, 2010). Se ha discutido que el Parkinsonismo es la consecuencia de las alteraciones de la función de los GB. De hecho, se ha considerado al sistema dopaminérgico como un modulador del circuito de los GB, debido a la inervación dopaminérgica hacia los núcleos de entrada y de salida (Bolam et al., 2000; Gerfen and Surmeier, 2011; Yelnik, 2002) (Figura 8B). Por consiguiente, la disminución de las concentraciones de dopamina en los núcleos de los GB podría promover cambios morfológicos, como disminución de la densidad de las espinas dendríticas en las MSN (GABAérgicas) del estriado, que puede alterar de manera abrupta la transmisión corticoestriatal (Azdad et al., 2009; Deutch et al., 2007). También se ha reportado la *upregulation* de los receptores D2 y una *dowregulation* del receptor D1 estriatales tanto en pacientes Parkinsonianos como en modelos animales (Gagnon et al., 2017). Debido a estas alteraciones neuroquímicas, se puede observar que la deficiencia de dopamina puede alterar el sistema GABAérgico, tanto de la vía directa como de la indirecta en modelos hemiparkinsonianos.

1.4.2.1. Generalidades de los modelos hemiparkinsonianos en roedores

Los modelos animales han permitido el estudio de los cambios fisiológicos y neuroquímicos observados en el parkinsonismo, debido a que reproducen características bioquímicas, fisiopatológicas y conductuales, similares a los síndromes parkinsonianos. Los modelos animales más utilizados en la investigación biomédica y los más reportados incluyen roedores tratados con 1-metil-4-fenil1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) o 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (Blandini and Armentero, 2012; Deumens et al., 2002). La 6-OHDA es el neurotóxico más utilizado para generar cambios en la actividad GABAérgica de las vías de los ganglios basales en respuesta al agotamiento de la dopamina y, por lo tanto, la inhibición del movimiento.

La 6-OHDA es un análogo estructural de las catecolaminas que puede inducir a la degeneración selectiva en las terminales nerviosas simpáticas noradrenérgicas y fue en ese entonces que se propuso el concepto de *denervación química* en la neurobiología, que consiste en la utilización de una molécula diana neurotóxica en una población

neuronal específica (Tranzer and Thoenen, 1973). Por consiguiente, la degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas provocada por la 6-OHDA se denomina como *denervación dopaminérgica*. Debido a que la 6-OHDA es una molécula hidrofílica, no puede cruzar la barrera hematoencefálica, por lo que es necesario administrar directamente a través de cirugía estereotáxica en la estructura cerebral de interés. Generalmente los núcleos dopaminérgicos más utilizados son la SNpc, el haz medial del cerebro anterior (MFB), el estriado y, en algunos casos, se ha inyectado intracerebroventricular (ICV) (Hernandez-Baltazar et al., 2017). La administración de la 6-OHDA tanto en la SNpc como en el MFB producen una lesión casi completa de las neuronas dopaminérgicas ya que tienen proyecciones axonales ascendentes al estriado. Por el contrario, las inyecciones de 6-OHDA en el estriado producen una lesión progresiva, retrograda y menos extensa en las neuronas dopaminérgicas de la vía nigro-estriatal, es así que esta estrategia puede ser utilizada para realizar estrategias farmacológicas para neuroprotección (Deumens et al., 2002; Hernandez-Baltazar et al., 2017; Przedborski et al., 1995).

Kirik y colaboradores en 1998 establecieron los parámetros óptimos para la lesión unilateral del estriado ventrolateral con una concentración de 20 μ g o 6 μ g de 6-OHDA inyectada en diferentes sitios del estriado. Concluyeron que el efecto de la inyección intraestriatal depende del sitio de lesión y de la concentración. Observaron que la dosis única administrada en un sitio del estriado causa una reducción del 80% en la inervación estriatal y una pérdida cercana al 90% de la población dopaminérgica nigral, mientras que una dosis administrada en varios sitios del estriado genera daño en núcleos de inervación extraestriatal, como el globo pálido (Kirik et al., 1998).

Los modelos animales utilizados para estudiar las anomalías en la actividad eléctrica de los núcleos de los GB observaron una menor actividad entre las NEM de la vía estriado-nigral en animales parkinsonianos que en condiciones normales. Por otra parte, la descarga espontánea y las respuestas a la estimulación cortical en las NEM de la vía estriado-palidal son mayores en animales parkinsonianos (Mallet et al., 2006). Debido a que la disminución de las concentraciones de dopamina a nivel estriatal, así

como una disminución de la activación del receptor D2, induce una deshibición de la vía estrado-palidal, y es así que induce una sobreactividad del globo pálido externo.

1.4.3. Modulación del sistema dopaminérgico sobre el GPe

Se ha demostrado que además de la inervación dopaminérgica estriatal, existe una significativa inervación de la SNpc hacia el GPe y el GPi tanto de humanos como en roedores (Eid and Parent, 2015; Eid and Parent, 2016) (Figura 9). Además, existe evidencia de concentraciones altas de dopamina en el globo pálido y, de manera particular, hasta seis veces más en el GPe que en el GPi (Rajput et al., 2008). Se ha destacado la importancia de la vía indirecta de los GB en el Parkinsonismo, debido a la disminución de dopamina estriatal observada tanto en pacientes como en modelos animales parkinsonianos. Sin embargo, también se observa una disminución de dopamina en el GPe en pacientes con Enfermedad de Parkinson. Así mismo, se ha demostrado que la denervación dopaminérgica induce a una amplia variedad de alteraciones en la excitabilidad neuronal, la plasticidad sináptica e inclusive cambios en la morfología celular del cuerpo estriado y también en GPe (Eid and Parent, 2016). Es por ello que, la sobreactivación GABAérgica de la vía estriado-palidal conduce a un incremento de la actividad del GPi/SNpr hacia las neuronas talamocorticales y, por lo tanto, se suprime el movimiento (Galvan and Wichmann, 2008) (Figura 8B).

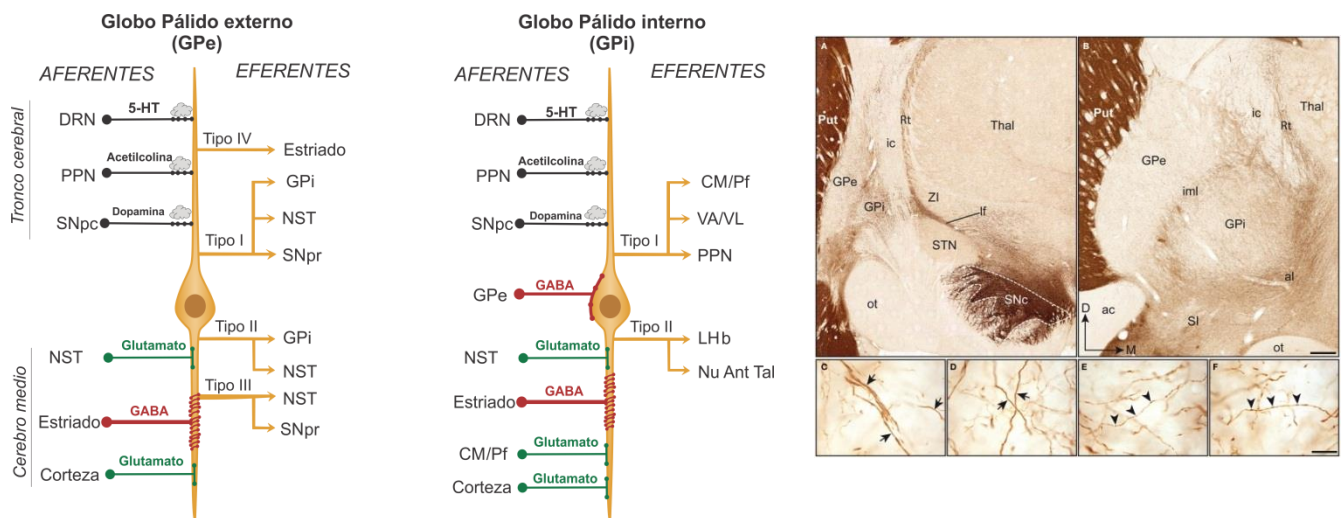


Figura 9. Inervaciones del globo pálido externo. A) Esquematación de las aferencias y eferencias del globo pálido externo e interno. Se observan las inervaciones dopaminérgicas, glutamatérgicas y GABAérgicas (Tomado y modificado de Eid y Parent, 2016) B) Se muestra la fotomicrografía de la tinción inmunohistoquímica de la tirosina hidroxilasa de las inervaciones dopaminérgicas en primates. (Tomado y modificado de Eid y Parent, 2015).

1.4.3.1. Alteraciones neurobiológicas del GPe en modelos parkinsonianos

El fenotipo de las neuronas GABAérgicas puede ser estudiado a través de la enzima de síntesis de GABA, la glutamato descarboxilasa (GAD). Esta enzima se presenta en dos isoformas, GAD65 y GAD67, y se expresan de forma ubicua en las neuronas GABAérgicas (Pinal and Tobin, 1998). La enzima GAD67 se expresa en terminales y cuerpos neuronales y puede sintetizar preferentemente GABA citoplásmico. Por otra parte, GAD65 se encuentra principalmente en las terminales nerviosas y puede estar involucrado principalmente en la síntesis de GABA para la liberación vesicular (Soghomonian and Martin, 1998). El ARNm de GAD se incrementa de forma selectiva en la vía estriatopallidal después de la degeneración dopaminérgica (Laprade and Soghomonian, 1999; Soghomonian and Laprade, 1997). Este hallazgo sustenta que, la vía indirecta está sobreactivada en el parkinsonismo, lo que resulta en un aumento de la actividad de los núcleos de salida.

Es necesario recalcar la regulación de la neurotransmisión GABAérgica tanto en condiciones fisiológicas como en condiciones patológicas, es debido a la sobreactivación de la vía estriado-palidal en la EP. Después de la liberación GABAérgica, el neurotransmisor es recapturado del espacio extracelular al espacio intracelular por medio de los transportadores de GABA; GAT1 en neuronas y GAT3 en neuronas y glía (Borden, 1996; Richerson and Wu, 2003). La expresión de GAT1 y GAT3 a nivel del SNC ha sido estudiado por técnicas de hibridación in situ y por inmunohistoquímica. El ARNm de GAT1 se expresa en las neuronas GABAérgicas del bulbo olfatorio, en los GB, el cerebelo y la retina. Sin embargo, se ha demostrado que el ARNm de GAT1 y GAT3 se encuentra en el globo pálido de ratas y monos (Jin et al., 2011). La administración local del antagonista de GAT1 (SKF89976A) aumenta significativamente las concentraciones de GABA en el espacio extracelular del GPe y, por lo tanto, disminuye el tono GABAérgico en las neuronas del GPe y GPi (Galvan et al., 2005). Por otra parte, se observó que la administración sistémica de tiagabina, un antagonista de GAT1 aumenta los niveles GABA hasta tres veces más en el GPe de rata (Fink-Jensen et al., 1992). Estos datos muestran que, en condiciones fisiológicas la inhibición de la recaptura de GABA

incrementa las concentraciones de este neurotransmisor en la vía directa de los GB y, por lo tanto, repercute en la actividad motora de los sujetos experimentales.

JUSTIFICACIÓN

II. JUSTIFICACIÓN

El sistema GABAérgico y dopaminérgico tienen un rol importante en la modulación del circuito de los GB. Sin embargo, las alteraciones observadas en estados parkinsonianos promueven la sobreactivación de la vía estriado-palidal del circuito de los GB. Si bien, la modulación dopaminérgica está ausente en modelos animales de la EP, se podría proponer algún objetivo molecular que pueda regular al sistema GABAérgico en la vía indirecta de los GB.

El ARNm del receptor GPR55 se expresa en el circuito de los GB, y es probable que cumpla papel en la modulación de las neuronas GABAérgicas de proyección estriatal, ya que probablemente, a través de sus vías de transducción de señales pueda regular la liberación de neurotransmisores. Esta hipótesis es propuesta ya que la proteína $G\alpha_{12/13}$ puede incrementar las concentraciones de Ca^{2+} , que se encuentran como reservas en el retículo endoplásmico liso. Además, recientemente se ha reportado que los antagonistas del receptor GPR55 pueden disminuir la liberación de neurotransmisores. Existen pocos reportes bibliográficos sobre la actividad GABAérgica relacionados con la activación del receptor GPR55 en el circuito de los GB. Sin embargo, el grupo de Fatemi y colaboradores investigaron el efecto de la administración de LPI en cuerpo estriado de ratas hemiparkinsonianas mostraron efectos similares sobre la actividad locomotora, tanto en términos de agonismo como de antagonismo de GPR55.

También se ha propuesto al receptor GPR55 como receptor que promueve la neuroprotección en modelos animales parkinsonianos. Sin embargo, se desconoce si, a pesar de la muerte neuronal dopaminérgica, podría tener efectos benéficos el receptor GPR55 sobre la modulación GABAérgica, o sobre otros sistemas de neurotransmisión. Además, se desconoce el rol del receptor en el GPe de modelos animales con denervación dopaminérgica. Es por ello que, en el presente trabajo se propusieron diseños experimentales que permitieran explicar el rol del receptor GPR55, en primera instancia, sobre su estructura e interacción con ligandos endógenos y exógenos, y en última instancia sobre las conductas motoras de animales hemiparkinsonianos.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

III. HIPÓTESIS

Tanto los agonistas como los antagonistas del receptor GPR55 interactúan en el sitio ortostérico del receptor, además el antagonismo de GPR55 en el globo pálido externo promueve la reversión del déficit motor de ratas hemiparkinsonianas, así como el incremento de marcadores GABAérgicos.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Estudiar el complejo ligando-receptor de GPR55 con herramientas de *docking* molecular y evaluar el efecto de la inyección intrapalidal de los agonistas y antagonistas del receptor GPR55 sobre la asimetría motora y las habilidades motoras finas de ratas hemiparkinsonianas.

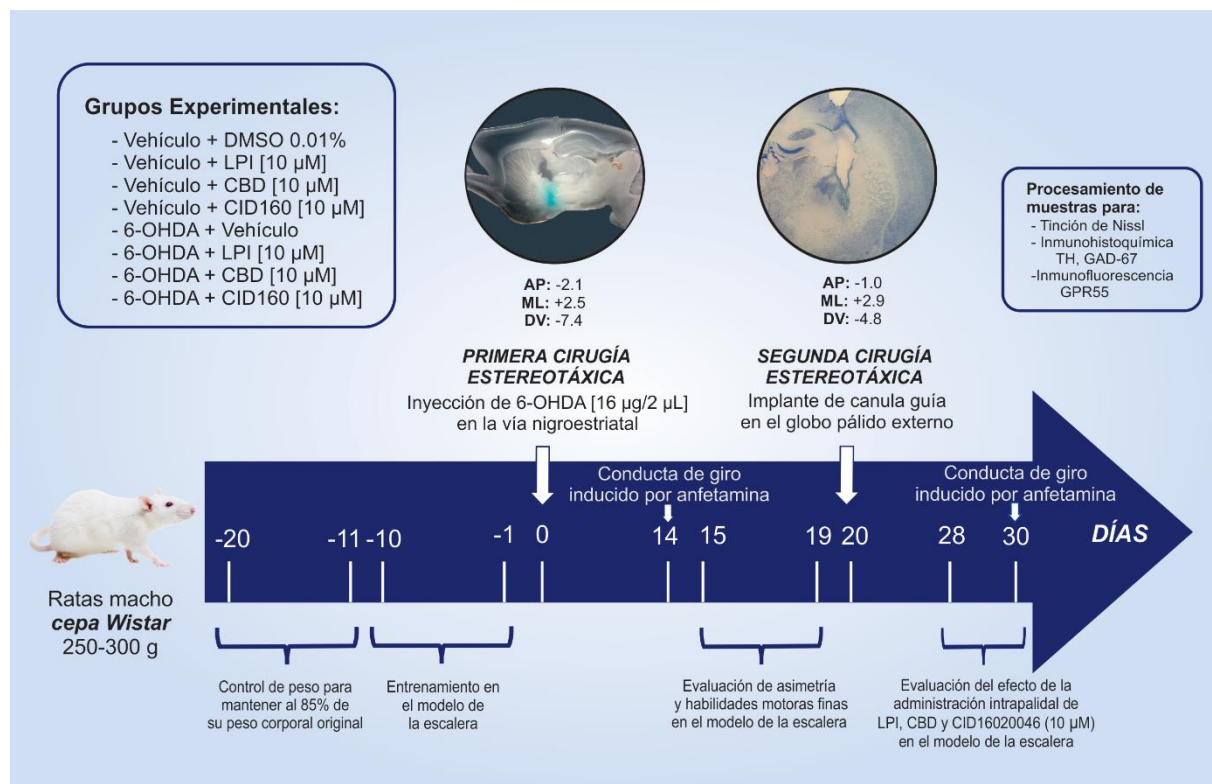
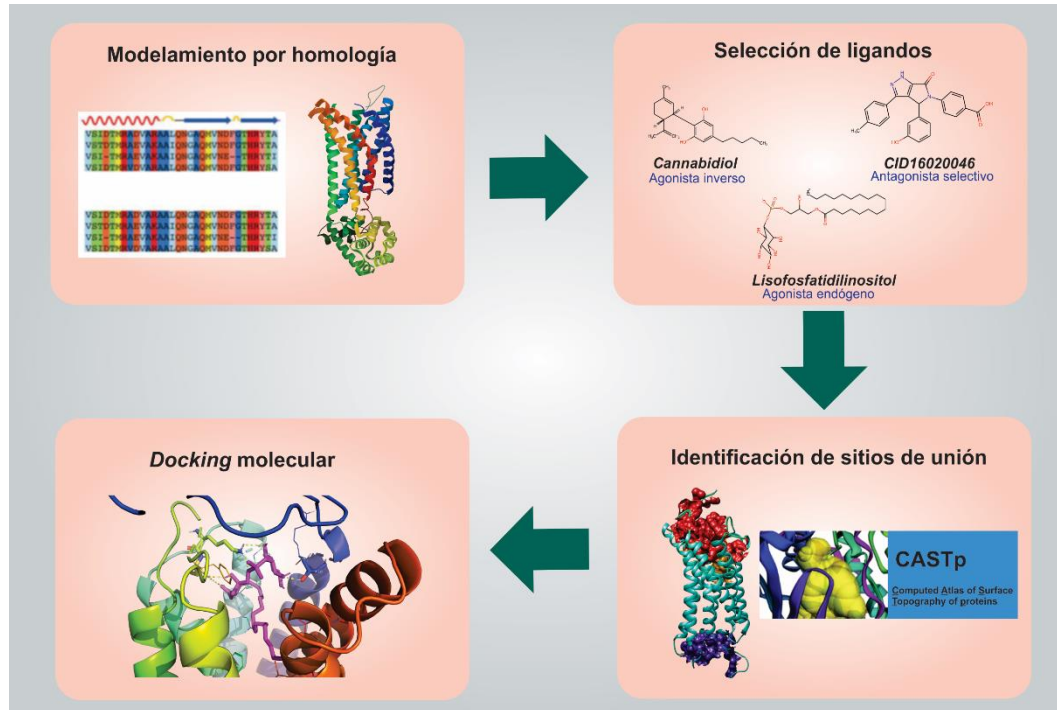
4.2. Objetivos específicos

1. Determinar los sitios de unión y las interacciones intermoleculares del complejo ligando-receptor de lisofosfatidilinositol, cannabidiol y CID16020046 con el receptor GPR55 mediante *docking molecular*.
2. Evaluar el efecto de la activación del receptor GPR55 en el globo pálido externo de ratas con denervación dopaminérgica inducida por 6-hidroxidopamina sobre la asimetría motora y las habilidades motoras finas.
3. Evaluar el efecto de la activación del receptor GPR55 en el globo pálido externo de ratas con denervación dopaminérgica inducida por 6-hidroxidopamina sobre la expresión proteica de tirosina hidroxilasa y GAD-67 en el estriado, globo pálido y *sustancia nigra pars compacta*.
4. Evaluar la expresión proteica del receptor GPR55 en estriado y globo pálido externo de ratas con denervación dopaminérgica inducida por 6-hidroxidopamina.

MATERIALES Y MÉTODOS

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Diagramas de trabajo



5.2. Análisis in silico

Se realizó el estudio de las secuencias del receptor GPR55 que se obtuvieron de la base de datos *Uniprot*. De tal manera que, se seleccionó al receptor GPR55 de la especie *Rattus norvegicus* para una mejor correlación entre los hallazgos *in silico* y los hallazgos con el modelo parkinsoniano. Los códigos de uniprot fueron los siguientes: GPR55 humano (Q9Y2T6), GPR55 rata (F1MAK4) y LPA6 Zebrafish (Q08BG4). El alineamiento múltiple de secuencias se realizó en el programa *Clustal omega*.

5.2.1. Modelamiento por homología

Como primer paso se realizó el modelado por homología con el propósito de generar una estructura tridimensional del receptor GPR55, debido a que no existe una estructura proteica que se haya realizado a través de técnicas analíticas como la difracción de rayos-X o resonancia magnética nuclear. Por lo tanto, para poder determinar las plantillas propicias para el receptor GPR55 se utilizó el servidor Swiss-Model. Posteriormente, se utilizó BLASTp para alinear las secuencias tanto de GPR55 como de la plantilla y, por último, se generó la estructura tridimensional con el programa Modeller.

5.2.2. Identificación de superficie molecular

Una vez obtenido la estructura tridimensional del receptor GPR55, se realizó una búsqueda específica sobre los probables sitios de unión que pudiera tener GPR55 con los servidores *Computed Atlas of Surface Topography of proteins* (CASTp) y DoGSiteScore del Zentrum für Bioinformatic – Universität Hamburg. A partir de este punto, se pudo generar una caja específica para realizar el análisis predictivo por medio del acoplamiento o *docking* molecular.

5.2.3. Docking molecular

El acoplamiento o *docking* molecular es una técnica computacional que predice la interacción molecular entre un ligante y un receptor. Se realizó el docking molecular entre el receptor GPR55 y sus ligandos: el endógeno de GPR55, el lisofosfatidilinositol (LPI); el agonista inverso, cannabidiol (CBD); y el antagonista selectivo CID16020046. La predicción de posibles interacciones moleculares se llevó a cabo con el software Autodock-Vina. Para visualizar las estructuras tridimensionales, y las interacciones

predichas por Autodock Vina, se utilizó PyMOL2 y para la visualizar las interacciones del ligante con el receptor, se utilizó el software LIGPLOT v.4.5.3. Debido a que los datos arrojados por los sistemas mostraron una interacción directa con el sitio ortostérico del receptor, se decidió trabajar con el LPI, CBD y CID16020046 para determinar si, los ligandos podrían tener respuestas farmacológicas en centros cerebrales encargados en el control del movimiento.

5.3. Sujetos de experimentación

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso de 250-300 g que fueron proporcionadas por el Bioterio “*Claude Bernard*” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP). Todos los animales fueron alojados en el vivario del Laboratorio de Neurofarmacología de la Facultad de Ciencias Químicas – BUAP, en cajas de acrílico, con una temperatura ambiente controlada (22 ± 3 °C), un ciclo luz/oscuridad 12/12 h, agua y alimento *ad libitum*. Todos los procedimientos experimentales, así como los protocolos para el cuidado y uso de animales para experimentación fueron cumplidos de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) y el Comité interno para el cuidado y uso de animales de laboratorio (CICUAL) de la BUAP.

5.4. Cirugía estereotáxica

Las ratas fueron sometidas a dos cirugías estereotáxicas para inducir el modelo hemiparkinsoniano con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y, posteriormente, para realizar el implante de una cánula guía en el GPe ipsilateral a la lesión. Cada sujeto fue elegido de manera aleatoria y posteriormente fueron anestesiados con Ketamina/Xilacina (75 mg/kg – 10 mg/kg, i.p.) para colocar la cabeza del animal en un aparato estereotáxico (Stoelting, Wood Dale, IL, EE. UU.) y, posteriormente localizar bregma. Se utilizaron las siguientes coordenadas para localizar la vía nigro-estriatal (AP: -2.1; ML: +2.4; DV: -7.3) según el atlas de (Paxinos and Watson, 1998). Se realizó la administración de la 6-OHDA a una concentración de 16 $\mu\text{g}/2 \mu\text{L}$ en del hemisferio izquierdo de la rata para inducir el hemiparkinsonismo. Posterior a la cirugía, se realizaron lo cuidados postoperatorios con la administración de un antiinflamatorio/analgésico (Tramadol, 10mg/kg, s.c.) así como la administración de un antibiótico (Enrofloxacin, 5 mg/kg i.m.). Al día veinte post-denervación dopaminérgica, se realizó una segunda cirugía para implantar una cánula

guía en el globo pálido externo (GPe). Las coordenadas utilizadas fueron las siguientes: AP: -1.0; ML: +2.9 DV: -5.5 de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson 1998. El implante de la cánula guía fue utilizada para la administración de LPI, CBD o CID160 en la rata con libre movimiento.

5.5. Administración de fármacos

El agonista LPI, el agonista inverso CBD y el antagonista selectivo CID16020046 fueron diluidos en dimetilsulfóxido (DMSO) al 0.01 % para realizar concentraciones de 10 μ M. Los fármacos se administraron en el GPe por medio de la cánula guía, y la microinyección fue de 1 μ L de LPI [10 μ M], 1 μ L de CBD [10 μ M] y 1 μ L de CID160 [10 μ M] mediante una jeringa Hamilton por tres días consecutivos, a los días 28, 29 y 30 post-cirugía. Por lo tanto, los grupos experimentales organizados a partir del día 28 post-cirugía fueron los siguientes: 1) Ac. Asc. + DMSO 0.01%; 2) Ac. Asc. + LPI 10 μ M; 3) Ac. Asc. + CBD 10 μ M; 4) Ac. Asc. + CID160 10 μ M; 5) 6-OHDA + DMSO 0.01%; 6) 6-OHDA + LPI 10 μ M; 7) 6-OHDA + CBD 10 μ M; 8) 6-OHDA + CID160 10 μ M.

5.6. Modelos conductuales

5.6.1. Conducta de giro

Se evaluaron todos los sujetos experimentales en la conducta de giro inducido por anfetamina para determinar el grado de denervación dopaminérgica por la administración de 6-OHDA en la vía nigroestriatal (Ungerstedt and Arbuthnott, 1970). A cada rata se les administró anfetamina (5 mg/kg s.c.) a los 14 días posterior a la administración de 6-OHDA. Inmediatamente se colocaron en cajas de plástico de 50 cm de diámetro y 40 cm de largo para evaluar el número de giros por un lapso de 100 minutos y, se cuantificaron y graficaron los giros acumulados en intervalos de 10 minutos. Solo se seleccionaron ratas que alcanzaron 14 giros por minuto. Posteriormente se realizó la administración de 1 μ L de LPI [10 μ M]; CBD [10 μ M] y CID160 [10 μ M] a los 28, 29 y 30 días posterior a la denervación dopaminérgica y cinco minutos después de la administración farmacológica, se realizó la administración de Anfetamina para la evaluación de la conducta de giro.

5.6.2. Modelo de la escalera

El modelo de la escalera fue propuesto como una herramienta conductual para evaluar el uso experto y la habilidad de agarre de las extremidades anteriores de la rata (Montoya y cols., 1991). El modelo está compuesto por una caja de acrílico, y constituido en la parte frontal con un par de escaleras removibles con 6 escalones cada una (izquierda y derecha). Cada escalón mide 15 mm de largo por 10 mm de ancho y 5 mm de altura y, en cada uno de los escalones se colocaron dos pellets de alimento, los cuales fueron tomados y comidos por la rata utilizando las extremidades delanteras. Los animales fueron sometidos a control de peso 10 días previos a comenzar el entrenamiento y se mantuvieron en control de peso durante los días de evaluación. El control consistió en restringir el consumo de alimento diario de los animales para lograr que bajaran el 15% de su peso corporal respecto a su peso inicial (Mendieta et al., 2009).

5.6.2.1. Asimetría motora

Posterior al control de peso, cada rata fue entrenada en el modelo de la escalera durante 10 minutos diarios por 10 días, con el objetivo de habituar a los animales y que aprendieran a tomar y comer los pellets de alimento localizados en los escalones de la prueba conductual, 12 pellets en la escalera izquierda y 12 pellets en la escalera derecha. Por lo tanto, se evaluó la capacidad de agarre de la pata ipsilateral respecto a la pata contralateral a la lesión. El rendimiento de los animales en la prueba reflejó dos parámetros: el número de pellets que sobraron o permanecieron en los escalones y el número de pellets fuera de los escalones (pellets que se perdieron durante la prueba) (Klein et al., 2007). La cuantificación de los tres parámetros se obtuvo con las siguientes formulas:

$$\#pellets\ comidos = 12 - (\#pellets\ que\ permanecen\ en\ los\ escalones + \#pellets\ fuera\ de\ los\ escalones)$$

$$\#pellets\ tomados = 12 - \#pellets\ que\ permanecen\ en\ los\ escalones$$

$$\% de\ agarre\ exitoso = \frac{\# de\ pellets\ comidos}{\# de\ pellets\ tomados} * 100$$

De acuerdo con las consideraciones de Klein y colaboradores, el parámetro # de pellets tomados es considerado como una medida de la actividad y motivación para alcanzar un objetivo y, por otra parte, el parámetro # de pellets comidos refleja la habilidad de los movimientos de alcance y agarre con las patas anteriores y, por lo tanto, los movimientos dependen directamente del rendimiento sensoriomotor. Por último, el parámetro de agarre exitoso muestra el acierto de todos los intentos de agarrar un pellet (Klein et al., 2007). Para el análisis de la prueba conductual en el modelo de la escalera, se realizó la videograbación con una cámara kodak de todos los periodos de evaluación: el entrenamiento, la evaluación del déficit motor y la evaluación de la administración de fármacos en GPe.

5.6.2.2. Habilidades motoras finas

La habilidad de agarre en el modelo de la escalera se evaluó de manera cuantitativa, debido a esto, se consideró también estudiar de manera cualitativa las habilidades motoras. Para este objetivo, se realizó el estudio de las habilidades motoras finas de los sujetos en experimentación sometidos en el modelo de la escalera y, se evaluaron los movimientos finos de las ratas durante los tres periodos de evaluación del protocolo experimental.

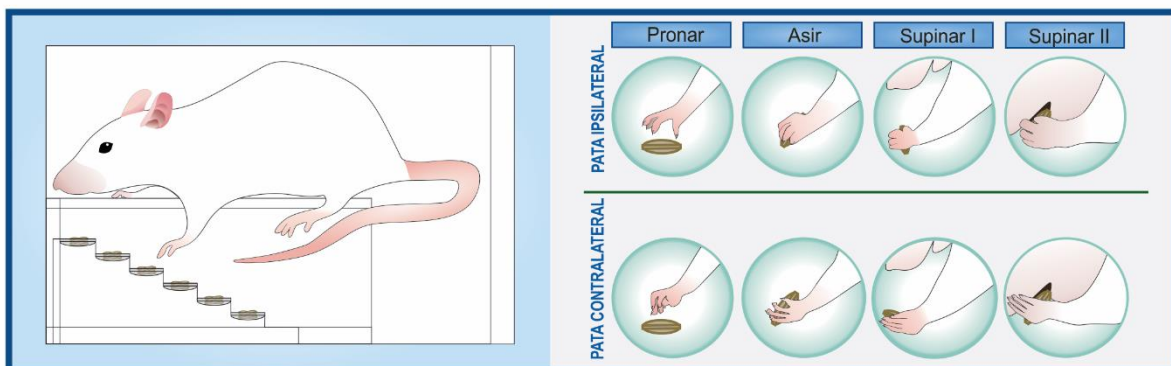


Figura 10. Representación esquemática sobre el modelo de la escalera. Las habilidades motoras finas se evaluaron en función de los miembros anteriores ipsilaterales y contralaterales a la denervación dopaminérgica, los cuales fueron pronar, asir, supinar I y supinar II.

Se utilizó la metodología propuesta por Metz y Wishaw, 2000 con algunas modificaciones. Los movimientos finos evaluados se agruparon en cuatro componentes, 1) el movimiento pronar, 2) el movimiento asir, 3) el movimiento supinar I y 4) el

movimiento supinar II (Figura. Los cuatro componentes fueron divididos en 10 subcomponentes más como se muestra en la figura (Metz and Whishaw, 2000). De acuerdo al desempeño de los animales, cada subcomponente tuvo los siguientes puntajes: 0.0, movimiento ausente; 0.5, con movimiento, pero anormal; y 1.0, movimiento normal.

5.7. Técnicas histológicas

Posterior a las pruebas conductuales, se realizó el sacrificio de las ratas (n=5) para determinar la morfología neuronal, la expresión de tirosina hidroxilasa (TH), de glutamato descarboxilasa 67 (GAD-67) y del receptor GPR55. Las ratas fueron sacrificadas por una sobredosis de pentobarbital sódico y se realizó la perfusión intracardiaca con 100 ml de solución salina isotónica al 0.9% y 200 ml de paraformaldehído al 4% (PFA) en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 (PBS) y posteriormente, se extrajo el cerebro y se almacenó en PFA al 4% durante 24 h. Una vez pasado el tiempo, se cortaron los cerebros en un vibratomo (Leica VT 1000 systems) y se realizaron cortes de 50 μm a nivel del estriado, SNpc y SNpr.

5.7.1. Evaluación morfológica por la Tinción de Nissl

La tinción de Nissl se realizó para evaluar la citoarquitectura de las neuronas y la correcta colocación de la cánula guía en el GPe. Por lo cual, se seleccionaron tres tejidos por rata, a una altura aproximada de AP: 0.9 respecto a bregma. Los tejidos fueron enjuagados con PBS 0.1M (pH 7.4) y se montaron en portaobjetos gelatinizados, de tal manera que se tiñeron con violeta de cresilo al 0.1% durante 10 min. Los portaobjetos se enjuagaron con agua destilada y posteriormente los tejidos se deshidrataron con grados ascendentes de alcohol. Por último, los tejidos se aclararon con xileno y se montaron con resina (Entellan Mounting Medium).

5.7.2. Determinación de la expresión de TH y GAD-67 por Inmunohistoquímica

Para la técnica de inmunohistoquímica se seleccionaron tejidos a nivel del estriado, GPe, SNpc y SNpr. Después de la selección, los tejidos se colocaron en placas de 24 pozos y se realizaron 3 lavados con PBS pH 7.4 y Tritón X-100 al 0.2% (PBS-T) durante 10 min cada uno a temperatura ambiente, una vez lavados, los tejidos fueron

incubados en H₂O₂ al 3% y en PBS-T durante 10 min para eliminar peroxidasa endógena. Los tejidos fueron lavados tres veces en PBS-T durante 10 min cada uno. Posteriormente se realizó el bloqueo con albúmina de suero bovino (BSA) al 2 % en PBST durante una hora. Una vez que se lavaron los tejidos tres veces con PBS-T, se incubaron los tejidos con el anticuerpo primario Anti-TH rabbit (Millipore®, 1:1000) o Anti-GAD-67 (Santa Cruz®, 1:50) durante 2 noches. Se realizaron los tres lavados con PBS-T durante 10 min cada uno y se realizó la incubación del anticuerpo secundario biotinilado goat anti-mouse (Jackson labs®, 1:500) por una hora. Después de los lavados correspondientes con PBS-T los tejidos fueron incubados con estreptavidina acoplado a HRP (Jackson labs®, 1:500) por una hora, se realizaron tres lavados con PBS sin tritón y posteriormente se realizó el revelado con diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich®) [50mg/100ml] y H₂O₂ al 30% para realizar la reacción colorimétrica mediante el HRP. Se midió el tiempo para evidenciar el marcaje de la reacción y se determinó 6 min para SNpc y 8 min para estriado. Al terminar con la inmunorreactividad se dejaron secar los tejidos durante 24 hrs y se deshidrataron a través de una batería de soluciones de etanol con las siguientes concentraciones: 80%, 90%, 100% y xilol para poder aclarar el tejido. Se colocó resina para montar las laminillas con cubreobjetos. Posteriormente se visualizaron las laminillas en un microscopio de campo claro (Leica DM 750®) y las fotografías fueron tomadas con una cámara digital acoplada (Leica ICC50®) con los objetivos 10x, 40x y 100x para el panel de fotografías y 10x para la cuantificación de las células positivas a TH.

5.7.3. Determinación del receptor GPR55 por inmunofluorescencia

Para la técnica de inmunofluorescencia el tejido cerebral se lavó con PBS-T por 10 min, tres veces consecutivas. Posteriormente se realizó el bloqueo con BSA al 2 % en PBST durante una hora. Una vez que se lavaron los tejidos tres veces con PBS-T, se incubaron los tejidos con el anticuerpo primario anti-GPR55 rabbit (Abcam®, 1:200) durante 2 noches a temperatura de 4°C. Se realizaron los tres lavados con PBS-T durante 10 min cada uno y, para la inmunodetección indirecta, se realizó la incubación del anticuerpo secundario específico conjugado con Lisamina-Rhodamine (Jackson Immuno Research, 1:200) por dos horas. Terminando el periodo de incubación, las muestras se lavaron tres veces con PBS cada 10 min. Finalmente, las preparaciones se incubaron

con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) durante un periodo de 20 minutos, después se lavaron y se montaron con Mowiol + DABCO como protector de fluorescencia y se cubrieron con cubreobjetos y se sellaron con esmalte. Posteriormente se visualizaron las laminillas en un microscopio Leica DM1000 acoplado a una cámara de captura Jenoptik Optical System con el Software ProgRes series.

5.7.4. Técnica para la cuantificación de imágenes por número de células positivas a TH.

La cuantificación de células inmunoreactivas a TH se realizó por el sistema de análisis de imágenes ImageJ (National Institutes of Health, USA) para identificar las neuronas positivas a TH en la SNpc. Una vez capturadas las imágenes se realizó el siguiente procedimiento. Se transformaron las fotos mediante la inversión de imagen, una vez invertida se ajustó el contraste para determinar el cuerpo neuronal de las neuronas TH⁺. Una vez evidenciado el cuerpo neuronal se realizó la cuantificación de forma manual con la herramienta multi point. Los resultados se grafican como número de neuronas TH⁺.

5.7.5. Técnica para cuantificación de imágenes por densidad óptica

Se realizó la cuantificación de la inmunorreactividad para la GAD-67 y GPR55 por medio de la densidad óptica en las fibras-terminales nerviosas en el estriado, GPe y SNpr. Se cuantificó en el Software ImageJ, se tomaron imágenes en microscopio de campo claro (Leica DM 750®) con objetivo 1.5x a lo largo del eje rostro caudal. Se transformaron las fotos a escala de grises 8bits, posteriormente se dibujó el contorno de la zona a medir del estriado, se dibujaron los umbrales y se ajustó el *dark background* para que quedara sólo la zona teñida con GAD-67 y GPR55, este procedimiento se realizó con las laminillas del grupo control (Intacto) y se toma este ajuste para las demás laminillas. Una vez realizado este proceso se procedió a realizar el análisis para obtener el porcentaje de área teñida y se realizó la medición que realiza el software de manera automática. Los resultados se grafican con el porcentaje de área teñida con respecto a los grupos experimentales.

5.8. Análisis estadístico

Los datos se presentan como media \pm error estándar de la media (EEM), donde los resultados del comportamiento de giro inducido por anfetaminas y las habilidades motoras finas se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de una prueba posterior de Bonferroni. La asimetría motora evaluada en el test de la escalera se analizó mediante un ANOVA de una vía seguido de un post-test de Tukey. Los resultados $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos para ambos análisis realizados. Para todos los análisis estadísticos se utilizó el software GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, Estados Unidos).

RESULTADOS

VI. RESULTADOS

6.1. El receptor GPR55 adopta tres sitios de unión con alto potencial farmacológico

Debido a que el receptor GPR55 es activado por una gama de cannabinoides y de lípidos no cannabinoides, se realizó la predicción computacional para definir los sitios de unión a ligandos del receptor por medio de dos servidores, CASTp y DoGSiteScore. Cabe mencionar que DoGSiteScore propone sitios con potencial farmacológico. Para determinar el sitio de unión y sus características moleculares, se utilizó la estructura tridimensional de GPR55 obtenido por modelamiento por homología y, posteriormente, se mapeó en CASTp y DoGSiteScore. Se identificaron tres sitios que se propusieron como bolsillo de unión para el receptor GPR55. La Figura 11 muestra la localización espacial de los tres sitios del receptor, que fueron identificados como S1, S2 y S3. El S1 se encuentra en la superficie extracelular y abarca sobre los dominios transmembranales TM1, TM2, TM3, TM6 y TM7. Por otro lado, el S2 parece estar ubicado en la zona lateral-superior entre los dominios TM3, TM4 y TM5. En la zona intracelular de del receptor se encuentra el S3, que abarca los loops intracelulares uno y dos (ICL1 e ICL2).

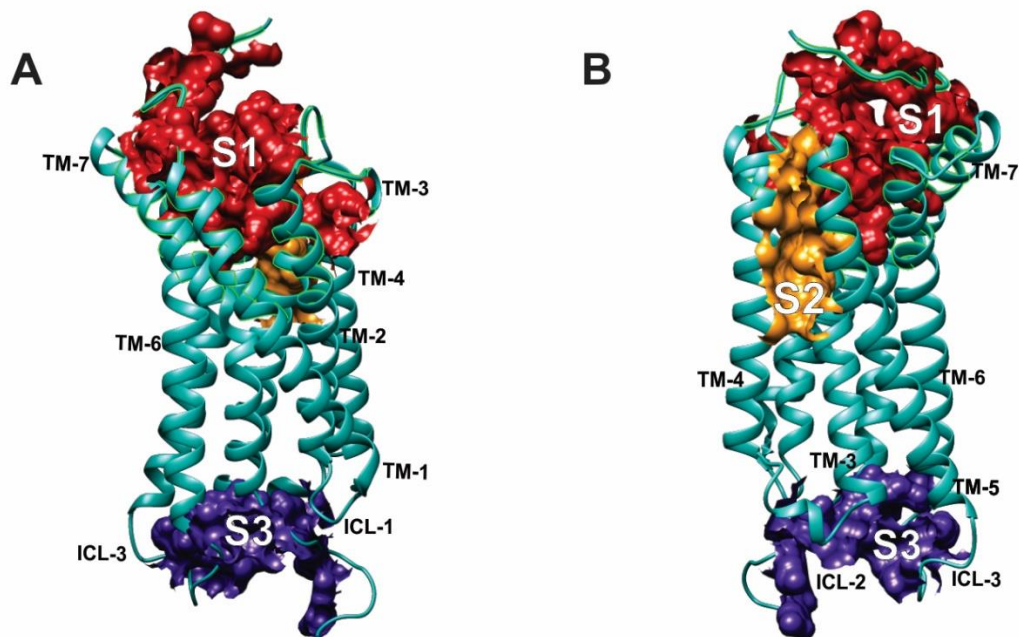


Figura 11. Sitios de unión a ligandos en el receptor GPR55. Se muestra en A) la localización espacial de S1 (superficie extracelular) y S3 (zona intracelular) y en B) la visualización de los tres sitios, en S2 muestra localizado en la zona lateral-superior.

En la Tabla 2 se muestran las características de los sitios de unión, tales como los volúmenes, las áreas, y el número de aberturas de los sitios encontrados con CASTp. En S1 mostró el sitio con mayor volumen en función de la superficie molecular (SM) con una A^3 de 4449.1 y, además tuvo el mayor número de aberturas en la SM (diez aberturas). Contrario a S1, el sitio S3 mostró un menor volumen que S2 (1515.5 y 633.8, respectivamente) y un menor número de aberturas en la SM (cuatro y tres, respectivamente).

Tabla 2. Volúmenes y áreas de los sitios de interacción de GPR55 (CASTp)

ID	Volumen basado en la superficie molecular (SM)	Área del bolsillo basado en la SM	Número de aberturas en la SM	Área total de las aberturas basado en la SM	Circunferencia total de la abertura en la SM
S1	4449.1	2627.0	10	499.9	297.6
S2	1515.5	855.3	4	330.2	150.1
S3	633.8	507.2	3	132.0	86.3

Para observar y determinar los sitios de unión en función del potencial farmacológico, se utilizó la herramienta DoGSiteScore, que permite evidenciar además otras características tales como el volumen, superficie y profundidad. Cabe mencionar que se muestran los principales sitios que cumplieron una característica, que fue la de seleccionar que los potenciales tuvieran un valor de 0.8 como mínimo.

En la Figura 12A se muestra la localización espacial de S1, S2 y S3, que son diferentes a los determinados por CASTp, por lo que, se consideró que de acuerdo con los datos de DoGSiteScore se agruparan los sitios respecto al potencial farmacológico. Particularmente, en la Tabla 3 se puede ver que S1 abarca un volumen (A^3) de 539.78 y su superficie (A^2) de 934.87 y, en la figura 12B se puede visualizar que S1 se localiza junto a los dominios TM-5, TM-6 y TM-7. De la misma manera, S2 posee un volumen y una superficie (804.93 y 1289.35, respectivamente) mayor que S1 y, en la figura 12C se muestra que S2 abarca su espacio sobre ECL2, TM-1, TM-2 y TM-3. Por último, se pudo determinar que S3 tiene un A^3 y A^2 con un valor de 399.74 y 391.47, respectivamente; en la figura 12D se puede visualizar que S3 abarca la zona intracelular del receptor y que

su espacio se localiza en TM-4, TM-5, TM-6 y TM7. Los valores del potencial farmacológico muestran un valor de 0.8 para S1-S, 0.86, 0.8. y 0.80, respectivamente.

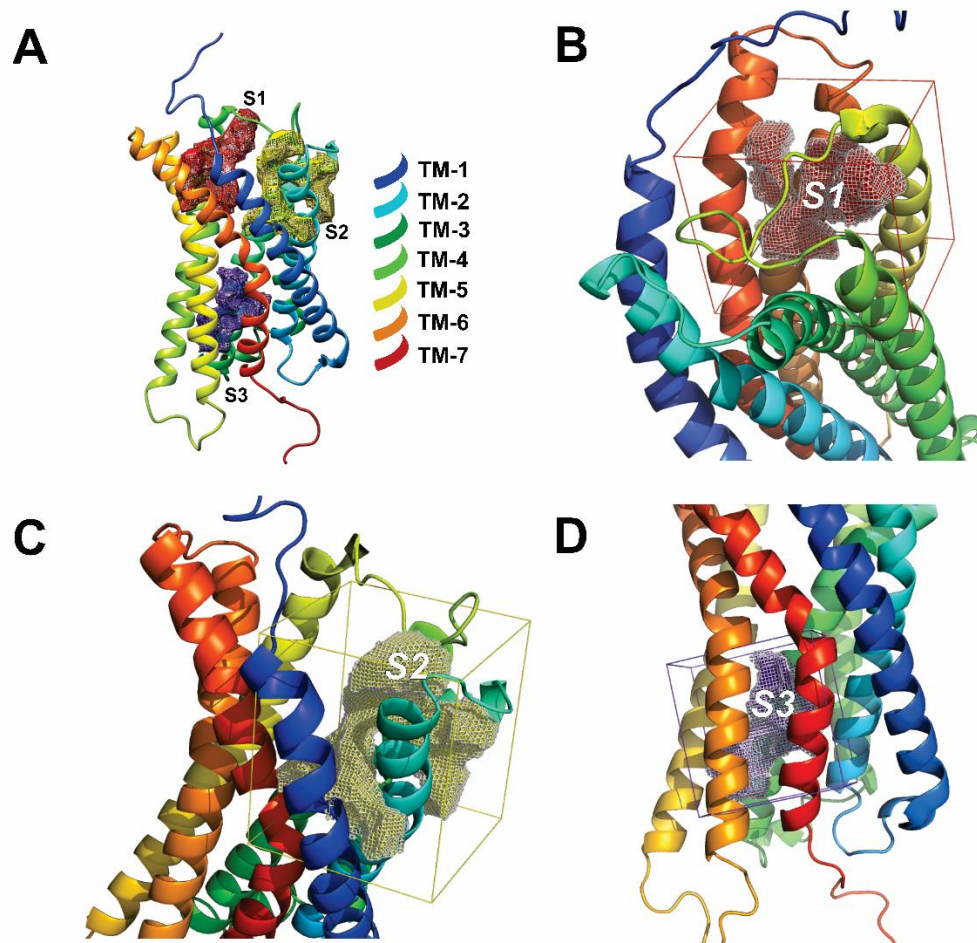


Figura 12. Sitios de unión a ligandos del receptor GPR55 respecto al potencial farmacológico. Se muestra en A) la localización espacial de S1 S2 y S3 de manera conjunta B) se visualiza el S1 y su interacción con el ECL3, TM-5, TM6 y TM7 de la superficie extracelular C) el S2 con interacción del ECL2, TM2 y TM3. D) Se localiza el S3 en la zona intracelular e interacción con los TM4, TM5, TM6 y TM7.

Tabla 3. Identificación de los sitios de unión a ligandos en el receptor GPR55 (DoGSiteScore)

Sitio	Volumen (Å ³)	Superficie (Å ²)	Profundidad (Å)	Potencial farmacológico
S1	539.78	934.87	24.1	0.86
S2	804.93	1289.35	17.86	0.82
S3	399.74	391.47	20.14	0.80

*La elección del potencial farmacológico fue seleccionada solo en valores >0.8

Tabla 4. Composición aminoacídica de los sitios de unión en el receptor GPR55 (DoGSiteScore)

Sitio	Relación de aminoácidos apolares	Relación de aminoácidos polares	Relación de aminoácidos con carga positiva	Relación de aminoácidos con carga negativa
S1	0.45	0.29	0.19	0.06
S2	0.58	0.29	0.11	0.03
S3	0.48	0.42	0.03	0.06

6.2. El receptor GPR55 y su interacción farmacológica LPI, CBD y CID160

Debido a que con los resultados previamente obtenidos se pudieron identificar dos sitios de unión con óptimas características moleculares, se pudo sugerir que S1 y S2 son apropiadas para que se lleve a cabo la interacción de los ligandos con el receptor GPR55. Por lo que, se realizó el acoplamiento molecular con los softwares AutoDockTools y AutoDock Vina, para poder predecir las probables interacciones del receptor con los siguientes ligandos: el LPI, el CBD y el CID 160. Cabe mencionar que se adaptaron las dimensiones de la caja que proporciona el software (grid box) con los parámetros volumétricos que correspondían las regiones S1 y S2 de acuerdo con CASTp y DoGSiteScore.

6.2.1. Interacciones del Lisofosfatidilinositol con el receptor GPR55

En la Figura 13A y 13C se muestra la estructura tridimensional y, en la Figura 13B la estructura bidimensional del LPI y la interacción con los residuos aminoacídicos del receptor GPR55, así como los enlaces de hidrógeno entre ligante-receptor. Se observa que un oxígeno del grupo fosfato de LPI acepta un enlace de hidrógeno con el grupo amino de Lys79 (TM2) con una distancia del enlace, 3.33 Å. Por otro lado, los grupos hidroxilo del C-5 y C-6 pueden aceptar un enlace de hidrógeno de Lys167 (TM5) con una distancia de los enlaces, 2.90 Å y 2.84 Å, respectivamente. Además, se pudo demostrar que, el hidroxilo C-4 del anillo inositol puede donar un enlace de hidrógeno a Cys168 (ECL2) con una distancia de los enlaces, 2.93 Å. Finalmente, la cadena alquilo de LPI interacciona con fuerzas de Van der Waals con otros residuos como Phe169, Tyr101, Leu270, Phe102, Arg161 y Leu274.

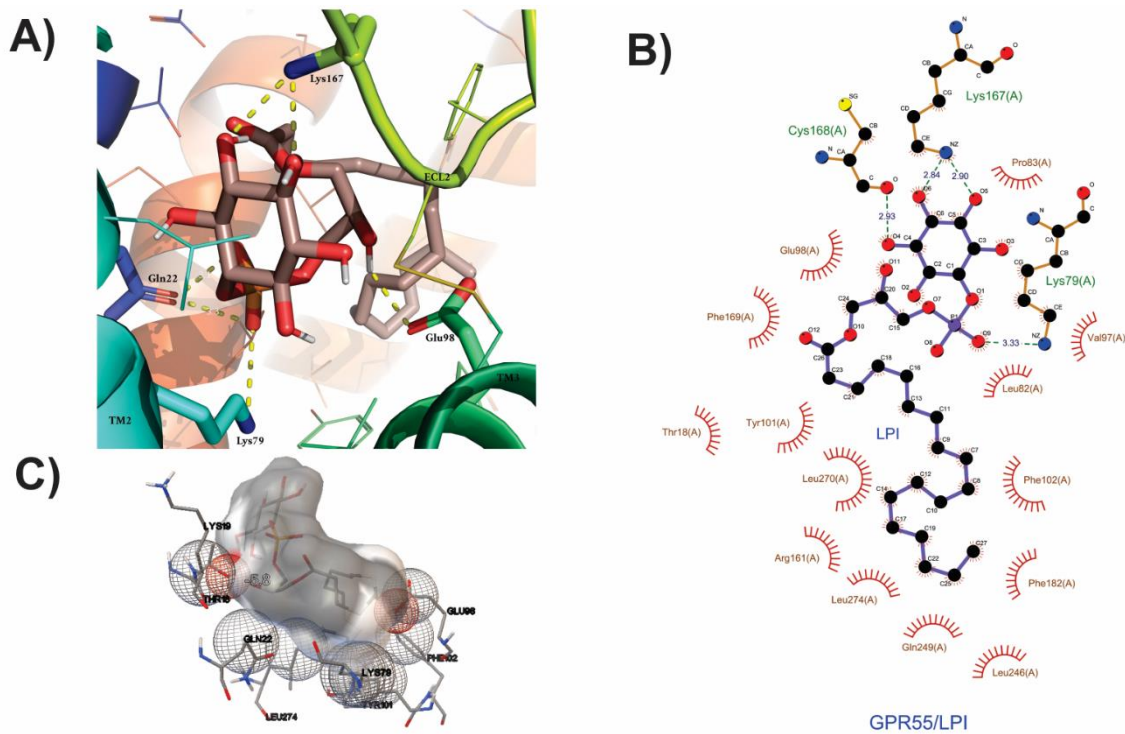


Figura 13. Interacción del lisofosfatidilinositol con el receptor GPR55. Se muestra en A) y B) representación tridimensional de las interacciones del LPI como agonista visto desde dos ángulos ópticos. C) Se muestran la energía de interacción de LPI y el GPR55. D) Representación bidimensional de LPI con GPR55.

6.2.2. Interacciones del CID16020046 con el receptor GPR55

En la Figura 14A y 14B se muestra la estructura tridimensional y, en la Figura 14B la estructura bidimensional del CID16020046 y la interacción de los residuos aminoacídicos del receptor GPR55, así como los enlaces de hidrógeno entre ligante-receptor. Se observa que un oxígeno del grupo carbonilo C-18, ácido benzoico de CID160 acepta un enlace de hidrógeno con el grupo amino de Lys167 (TM5) con una distancia del enlace, 3.17 Å. Además, el grupo hidroxilo del 3-hidroxifenilo C-29, dona un enlace al oxígeno de Gln249 (TM6) con una distancia del enlace, 3.02 Å. Se puede observar interacciones de Van der Waals con los residuos Tyr101, Phe102, Leu270, Phe169, Val224 con el anillo 4-metilfenil y el núcleo pirazolactam de CID160.

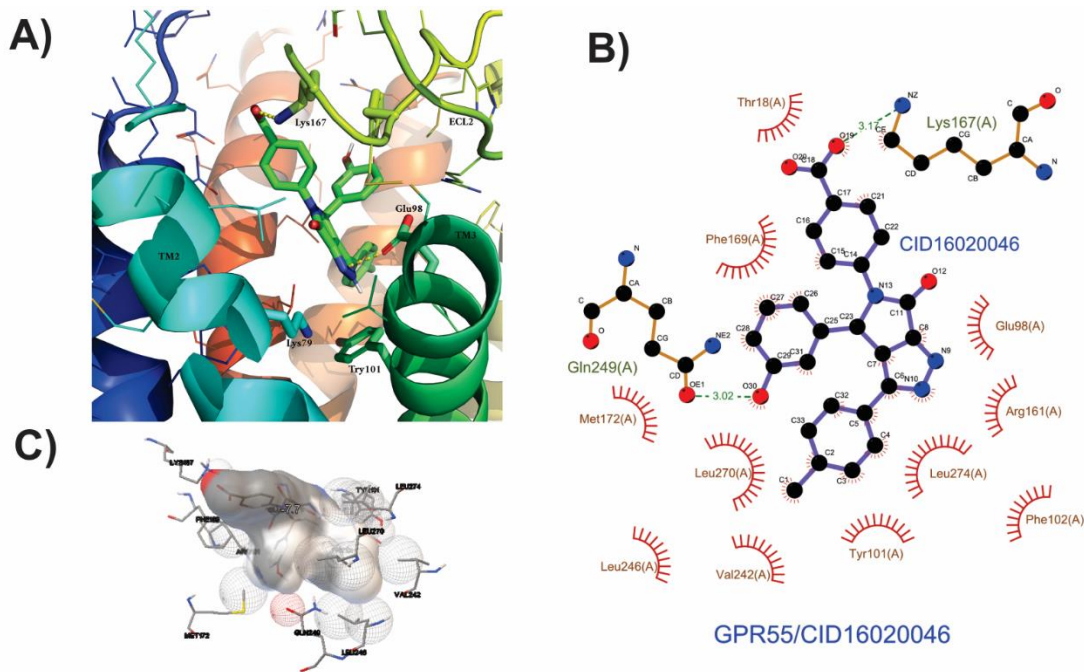


Figura 14. Interacción del CID16020046 con el receptor GPR55. Se muestra en A) y B) representación tridimensional de las interacciones del CID160 como antagonista selectivo visto desde dos ángulos ópticos. C) Se muestran la energía de interacción de CID160 y el GPR55. D) Representación bidimensional de CID160 con GPR55.

6.2.3. Interacciones del Cannabidiol con el receptor GPR55

En la Figura 15A y 15C se muestra la estructura tridimensional y, en la Figura 15B la estructura bidimensional del CBD y la interacción con los residuos aminoacídicos del receptor GPR55, así como los enlaces de hidrógeno entre ligante-receptor. Se observa que el grupo hidroxilo C-24 de CBD dona un enlace de hidrógeno a Glu98 (TM3) con una distancia del enlace, 2.69 Å. Se observan interacciones hidrofílicas con los residuos Leu274, Leu270, Val97, Leu82, con la cadena alifática y el ciclohexano de CBD.

6.2.4. El Lisofosfatidilinositol, CID16020046 y Cannabidiol comparten el sitio de unión ortostérico de GPR55

Para determinar si los enlaces de unión de los ligantes utilizados en el docking molecular se unen al sitio ortostérico de GPR55, se realizó un empalme de LPI, CID160 y CBD con el modelo tridimensional de GPR55. En la Figura 16A se representan los dominios transmembranales (TM) que participan en el sitio de unión, TM2, TM3, TM5,

TM6, TM7 y ECL2. En la Figura 16B se muestra que, los tres ligantes se unen al sitio ortostérico y comparten residuos aminoacídicos como Lys167, Gln249, Glu98, Phe169 y Leu270.

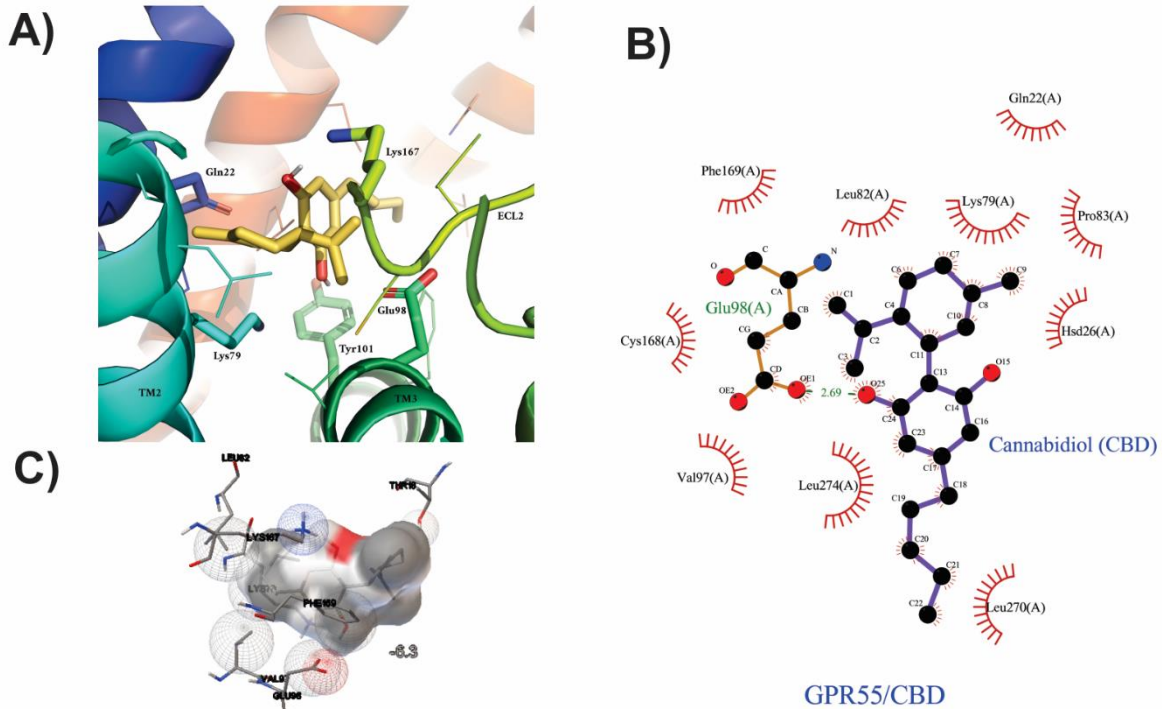


Figura 15. Interacción del cannabidiol con el receptor GPR55. Se muestra en A) y B) representación tridimensional de las interacciones del CBD como agonista visto desde dos ángulos ópticos. C) Se muestran la energía de interacción de CBD y el GPR55. D) Representación bidimensional de CBD con GPR55.

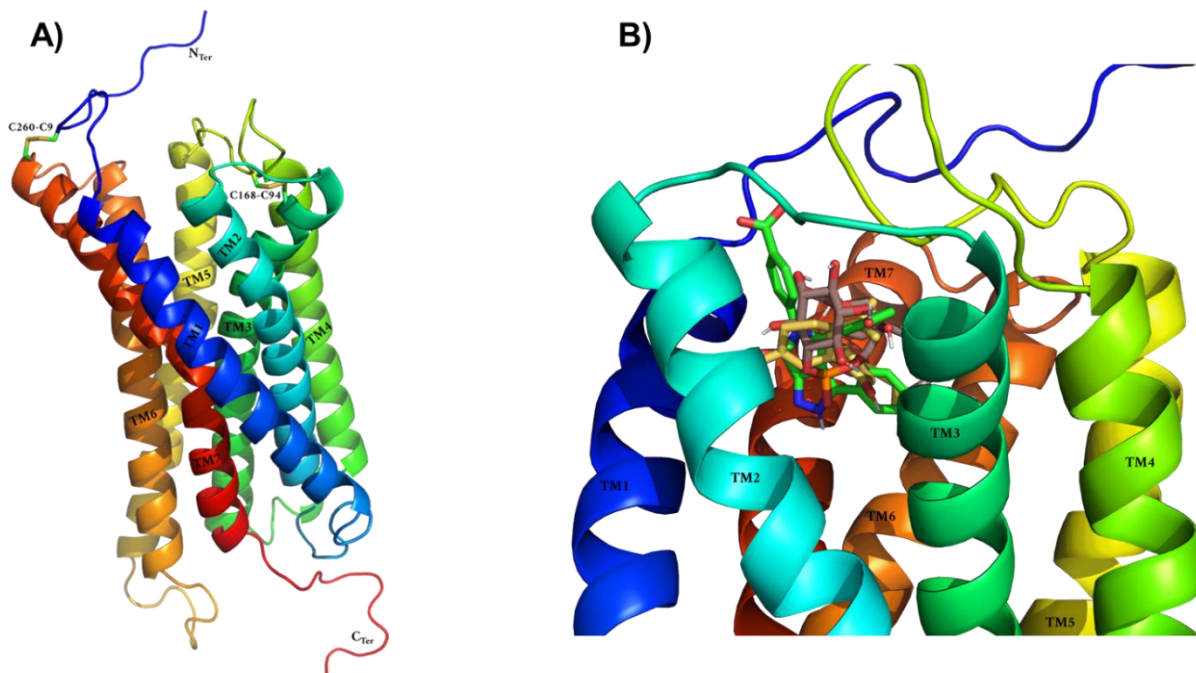


Figura 16. Interacciones intermoleculares de CBD con GPR55. A) Representación bidimensional de las interacciones de CBD y GPR55, líneas punteadas color verde son los enlaces de hidrógeno. B) Representación tridimensional de LPI con GPR55, líneas amarillas muestra las interacciones estables entre ligante receptor. TM: 42 transmembrana, ECL: loop extracelular.

6.3. La activación y la inhibición del receptor GPR55 en el globo pálido externo mejora la asimetría motora en ratas hemiparkinsonianas

Para dar evidencia de la denervación dopaminérgica en las ratas inyectadas con 6-OHDA en la vía nigroestriatal, se realizó la evaluación de la conducta de giro inducido con anfetamina al día 14 post-cirugía. La gráfica de la figura 17A, muestra un incremento de los giros ipsilaterales a la lesión del grupo 6-OHDA a partir del minuto 20 (2.24) logra un pico máximo al minuto 60 (13.45) y un descenso al minuto 100 (10.14) respecto al grupo Ac. Asc. 0.02%. Es importante mencionar que se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los grupos 6-OHDA respecto al grupo Ac. Asc 0.02% al día 14 y día 30 ($p < 0.001$). Posteriormente, los dos grupos experimentales (Ac. Asc. y 6-OHDA) se subdividieron en seis grupos para administrar LPI [10 μ M] y CBD [10 μ M] a los días 28, 29 y 30.

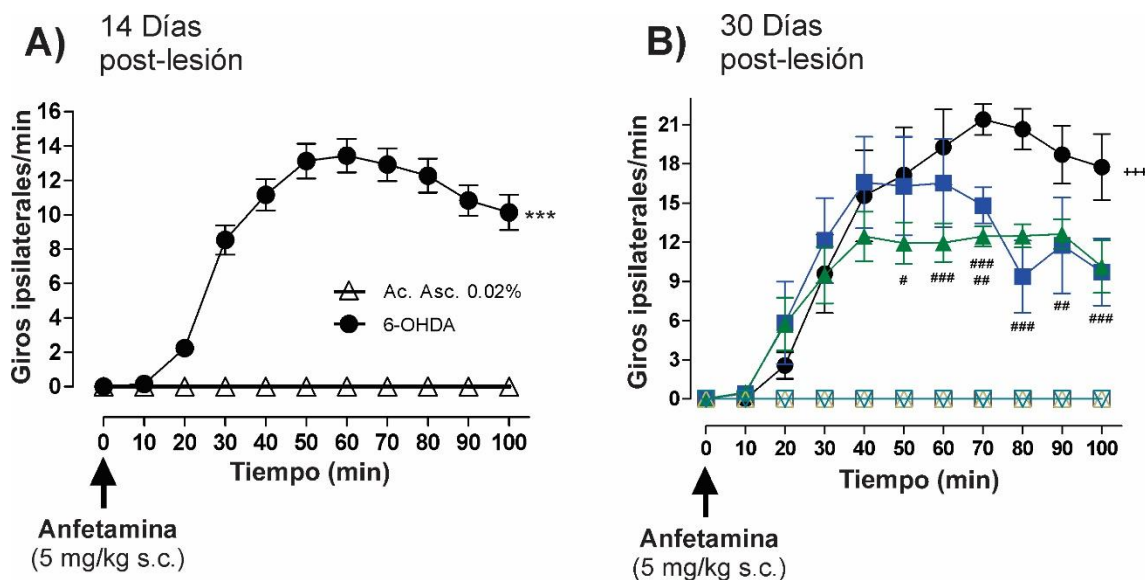


Figura 17. La administración de LPI y CBD en el GPe disminuye la conducta de giro inducido por anfetamina en ratas hemiparkinsonianas. A) Evaluación de la conducta de giro 14 días después de la inyección de 6-OHDA en la vía nigroestriatal. B) Evaluación de la conducta de giro inducido por anfetaminas y la administración intrapalldal LPI [10 μ M], CBD [10 μ M] o vehículo (DMSO 0,01%) a los 30 días post-lesión. Se muestra la media \pm el EEM, los datos fueron evaluados con una ANOVA de dos vías prueba post-hoc de Bonferroni. *** $p < 0.001$ vs Ac. Asc. 0.02%; +++ $p < 0.001$ vs Ac. Asc. + DMSO 0.01%; # $p < 0,05$, ## $p < 0.01$ y ### $p < 0.001$ vs 6-OHDA + DMSO 0,01%; (n = 6-8 / grupo).

La Figura 17B, muestra la conducta de giro evaluada el día 30 post-cirugía y el efecto de la activación e inhibición del receptor GPR55 intrapalldal. Se puede observar un incremento significativo de los giros ipsilaterales del grupo 6-OHDA + DMSO 0.01% a partir del minuto 30 (9.57), alcanza un punto máximo al minuto 70 (21.4) y disminuye

levemente al minuto 100 (17.75). Tanto el grupo 6-OHDA + LPI 10 μ M como el grupo 6-OHDA + CBD 10 μ M muestran una disminución evidente en los intervalos 70 y 80 minutos (14.82 y 12.44; 9.35 y 12.48), respectivamente ($p < 0.01$).

6.4. La activación del receptor GPR55 en el globo pálido externo no modifica el déficit motor de ratas hemiparkinsonianas en el modelo de la escalera

Para obtener el modelo parkinsoniano, se inyectó 6-OHDA en la vía nigroestriatal de ratas por cirugía estereotáxica y la activación de GPR55 se realizó con el agonista lisofosfatidilinositol (LPI) a una dosis de [10 μ M]. Al día 19 se evaluó la lesión dopaminérgica en el modelo de la escalera, los resultados muestran un déficit motor de la extremidad contralateral del grupo 6-OHDA ya que, disminuye el número de pellets comidos (3.6 \pm 1.7), tomados (5.5 \pm 0.74) y el porcentaje de agarre exitoso (60.1 \pm 3.9), respecto al grupo ácido ascórbico (pellets comidos: 11.25 \pm 0.21, pellets tomados: 11.0 \pm 0.23, % agarre exitoso: 89.3 \pm 2.6). Al día 30 post-cirugía se evaluó el efecto de cada tratamiento farmacológico. Los grupos 6-OHDA + DMSO y 6-OHDA + LPI muestran una disminución del número de pellets comidos (1.8 \pm 0.47; 1.4 \pm 0.4) (Figura 18A), tomados (4.8 \pm 0.73; 3.0 \pm 0.77) (Figura 18B) y el porcentaje de agarre exitoso (38.4 \pm 6.2; 45.4 \pm 3.3) (Figura 18C) comparados con el grupo Ac. Ascórbico + DMSO (pellets comidos: 10.0 \pm 0.57, pellets tomados: 11.0 \pm 0.57, % agarre exitoso: 91.1 \pm 5.2). Es importante mencionar que se encontró una diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de agarre exitoso del grupo 6-OHDA al día 19 respecto al grupo 6-OHDA al día 30 ($p < 0.001$). Finalmente, el número de pellets comidos del grupo 6-OHDA + LPI muestra una diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo 6-OHDA 19 días post-lesión. No se observaron cambios significativos en los grupos controles de la pata ipsilateral (Figura 18).

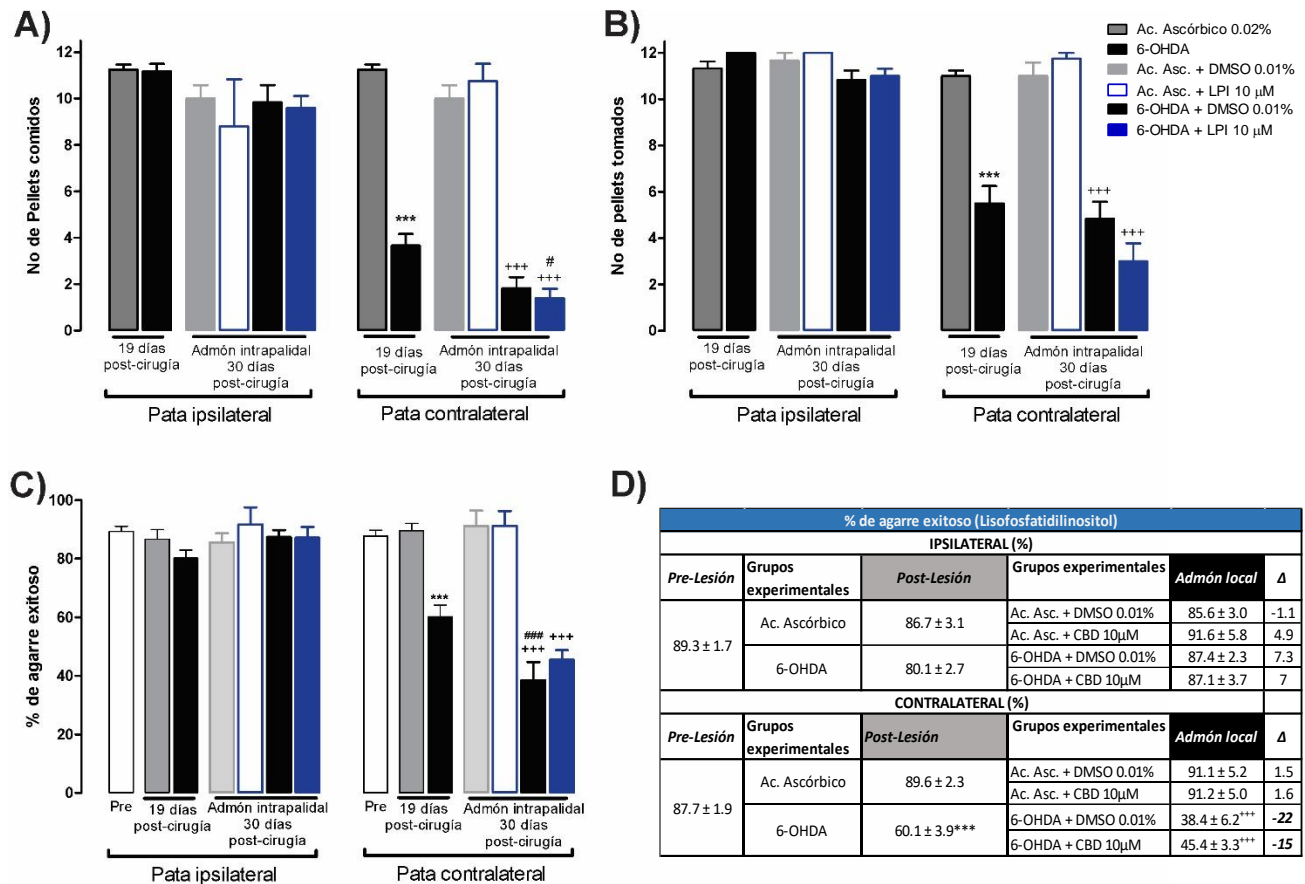


Figura 18. La activación de GPR55 no modifica el déficit motor de ratas hemiparkinsonianas en el modelo de la escalera. A) Cuantificación del número de pellets comidos, B) Número de pellets tomados, C) porcentaje de agarre exitoso. Se evaluaron los grupos vehículo y 6-OHDA al día 19 post-lesión. Al día 30 post-cirugía se evaluaron los grupos formados por cada tratamiento farmacológico. D) Tabla representativa del porcentaje de agarre exitoso en periodo pre-cirugía, post-cirugía y administración local de LPI. El incremento y decremento porcentual se muestra con el signo Δ. Se muestra la media ± el EEM, los datos fueron evaluados con una ANOVA de una vía y una prueba post hoc Tuckey. ***p<0.001 vs Ac. Ascórbico 0.02%; +++p<0.001 vs Ac. Asc. + DMSO 0.01%; ###p<0.001 vs 6-OHDA día 19 (n=5-7 por grupo).

6.5. El antagonismo selectivo del receptor GPR55 mejora el comportamiento motor de ratas hemiparkinsonianas en el modelo de la escalera

Se realizó el mismo diagrama experimental pero ahora con el antagonista selectivo del receptor GPR55. Al día 19 se evaluó la lesión dopaminérgica en el modelo de la escalera, los resultados muestran un déficit motor de la extremidad contralateral del grupo 6-OHDA ya que, disminuye el número de pellets comidos (3.6 ± 1.7), tomados (12 ± 0) y el porcentaje de agarre exitoso (63.1 ± 5.3), respecto al grupo ácido ascórbico (pellets comidos: 11.2 ± 0.21 , pellets tomados: 11.0 ± 0.23 , % agarre exitoso: 87.7 ± 2.5) (Figura 19).

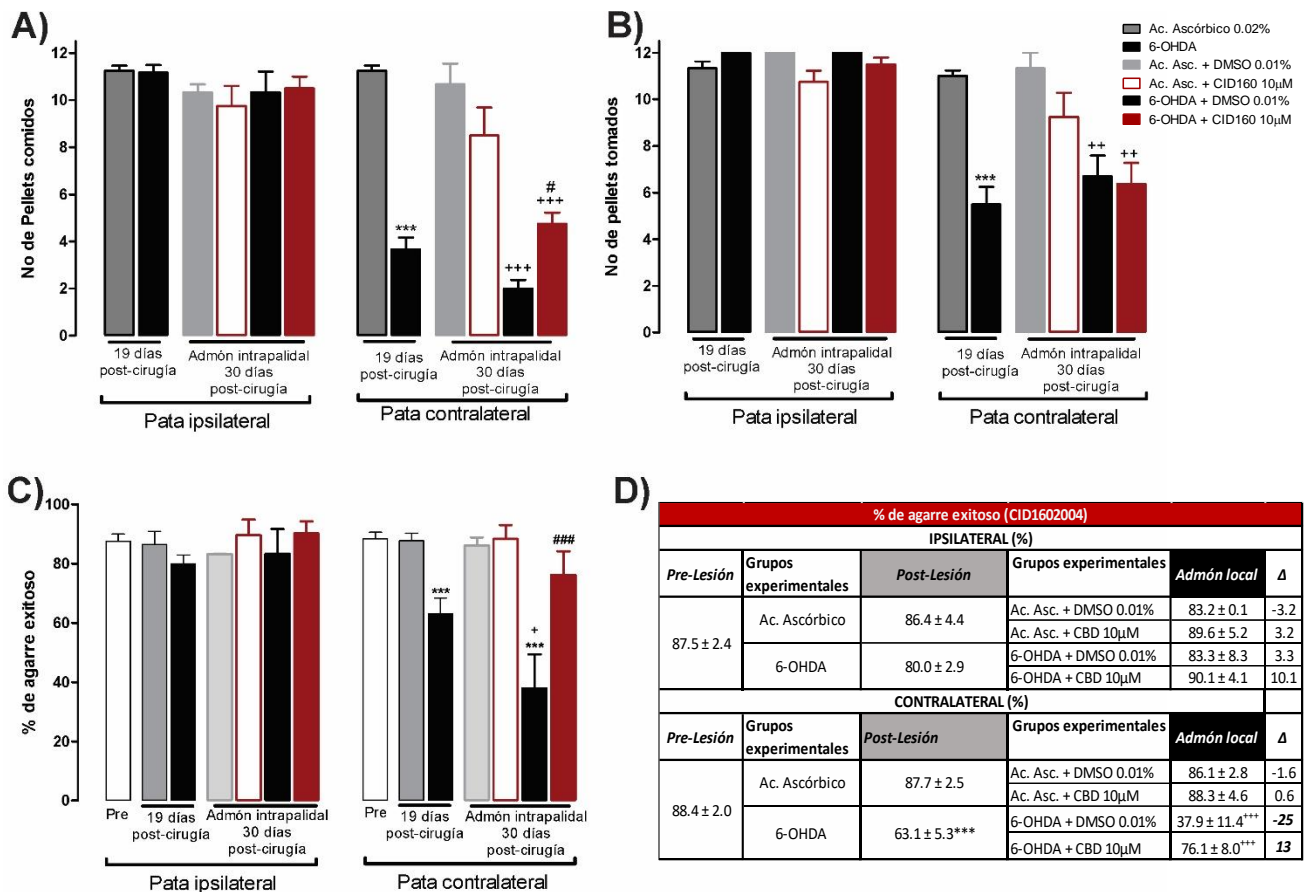


Figura 19. El antagonismo selectivo del receptor GPR55 mejora el comportamiento motor de ratas hemiparkinsonianas en el modelo de la escalera. A) Cuantificación del número de pellets comidos, B) Número de pellets tomados, C) porcentaje de agarre exitoso. Se evaluaron los grupos vehículo y 6-OHDA al día 19 post-lesión. Al día 30 post-cirugía se evaluaron los grupos formados por cada tratamiento farmacológico. D) Tabla representativa del porcentaje de agarre exitoso en periodo pre-cirugía, post-cirugía y administración local de LPI. El incremento y decremento porcentual se muestra con el signo Δ. Se muestra la media ± el EEM, los datos fueron evaluados con una ANOVA de una vía y una prueba post hoc Tuckey. ***p<0.001 vs Ac. Ascórbico 0.02%; +p<0.05; ++p<0.01; +++p<0.001 vs Ac. Asc. + DMSO 0.01%; #p<0.05; ###p<0.001 vs 6-OHDA día 19. (n=5-7 por grupo).

Al día 30 post-cirugía se evaluó el efecto de cada tratamiento farmacológico. Los grupos 6-OHDA + DMSO muestran una disminución del número de pellets comidos (2.0 ± 0.36) (Figura 19A), tomados (6.7 ± 0.9) (Figura 19B) y el porcentaje de agarre exitoso (37.9 ± 11.34) (Figura 19C) comparados con el grupo Ac. Ascórbico + DMSO (pellets comidos: 10.6 ± 0.88 , pellets tomados: 11.3 ± 0.66 , % agarre exitoso: 86.1 ± 2.8). Se encontró una diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de agarre exitoso del grupo 6-OHDA al día 19 respecto al grupo 6-OHDA al día 30 ($p < 0.001$). A diferencia del grupo control con 6-OHDA + DMSO, el grupo 6-OHDA + CID160 muestra una disminución del número de pellets comidos (4.7 ± 0.47) (Figura 19A) y tomados (6.3 ± 0.89) (Figura 19B) comparados con el grupo Ac. ascórbico + DMSO ($p < 0.001$). Finalmente, el número de pellets comidos del grupo 6-OHDA + CID160 (4.7 ± 0.47) y el porcentaje de agarre

exitoso (76.1 ± 8.0) se encontró una diferencia significativa respecto al grupo 6-OHDA + DMSO ($p < 0.05$ y $p < 0.001$, respectivamente) (Figura 19C). No se observaron cambios significativos en los grupos controles de la pata ipsilateral (Figura 19).

6.6. La administración intrapalidal de Cannabidiol mejora el comportamiento motor de ratas hemiparkinsonianas

Por último, se utilizó el cannabidiol, agonista inverso de GPR55 con el mismo diagrama experimental. Al día 19 se evaluó la lesión dopaminérgica en el modelo de la escalera y, los resultados muestran un déficit motor de la extremidad contralateral del grupo 6-OHDA ya que, disminuye el número de pellets comidos (3.6 ± 0.4), tomados (5.5 ± 0.74) y el porcentaje de agarre exitoso (83.1 ± 3.6), respecto al grupo ácido ascórbico (pellets comidos: 11.2 ± 0.75 , pellets tomados: 11.0 ± 0.70 , % agarre exitoso: 89.3 ± 1.7).

Al día 30 post-cirugía se evaluó el efecto de cada tratamiento farmacológico. Los grupos 6-OHDA + DMSO muestran una disminución del número de pellets comidos (2.0 ± 0.36) (Figura 20A), tomados (7.0 ± 1.0) (Figura 20B) y el porcentaje de agarre exitoso (32.4 ± 10.1) (Figura 20C) comparados con el grupo Ac. Ascórbico + DMSO (pellets comidos: 11.0 ± 0.57 , pellets tomados: 12.0 ± 0.01 , % agarre exitoso: 86.0 ± 2.8). Se encontró una diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de agarre exitoso del grupo 6-OHDA al día 19 respecto al grupo 6-OHDA al día 30 ($p < 0.001$). A diferencia del grupo control con 6-OHDA + DMSO, el grupo 6-OHDA + CBD muestra una disminución del número de pellets comidos (6.7 ± 0.56) (Figura 20A) y tomados (7.6 ± 0.62) (Figura 20B) comparados con el grupo Ac. ascórbico + DMSO ($p < 0.001$). Finalmente, el número de pellets comidos del grupo 6-OHDA + CBD (6.7 ± 0.47) y el porcentaje de agarre exitoso (89.5 ± 3.7) se encontró una diferencia significativa respecto al grupo 6-OHDA + DMSO ($p < 0.05$ y $p < 0.001$, respectivamente) (Figura 20C). No se observaron cambios significativos en los grupos controles de la pata ipsilateral (Figura 20).

6.7. El agonismo del receptor GPR55 disminuye las habilidades motoras finas de ratas hemiparkinsonianas

Todos los grupos experimentales evaluados en el modelo de la escalera fueron videograbados para posteriormente evaluar los movimientos finos. Se utilizó el protocolo propuesto por Metz y Wishaw, 2000 con algunas modificaciones.

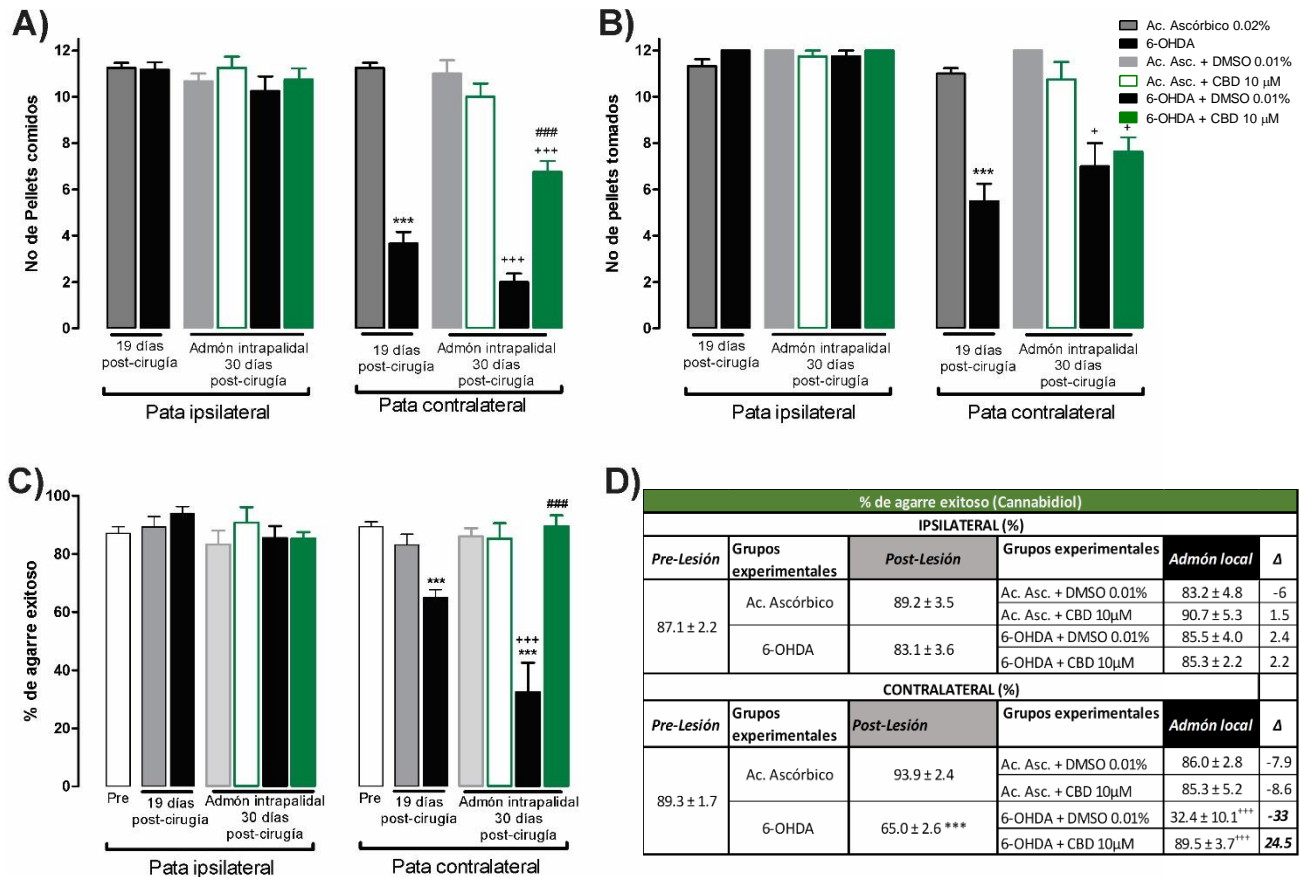


Figura 20. La administración intrapalidal de CBD mejora el comportamiento motor de ratas hemiparkinsonianas en el modelo de la escalera. A) Cuantificación del número de pellets comidos, B) Número de pellets tomados, C) porcentaje de agarre exitoso. Se evaluaron los grupos vehículo y 6-OHDA al día 19 post-lesión. Al día 30 post-cirugía se evaluaron los grupos formados por cada tratamiento farmacológico. D) Tabla representativa del porcentaje de agarre exitoso en periodo pre-cirugía, post-cirugía y administración local de LPI. El incremento y decremento porcentual se muestra con el signo Δ. Se muestra la media ± el EEM, los datos fueron evaluados con una ANOVA de una vía y una prueba post hoc Tuckey. ***p<0.001 vs Ac. Ascórbico 0.02%; +p<0.05; +++p<0.001 vs Ac. Asc. + DMSO 0.01%; ###p<0.001 vs 6-OHDA día 19 (n=5-7 por grupo).

El movimiento fino se clasificó en cuatro componentes: pronar, asir, supinar I y supinar II. Los cuatro componentes del movimiento a su vez se clasificaron en 10 subcomponentes (ver Figura 24D). De acuerdo al desempeño de los animales, cada subcomponente tuvo los siguientes puntajes: 0.0, movimiento ausente; 0.5, con movimiento, pero anormal; y 1.0, movimiento normal.

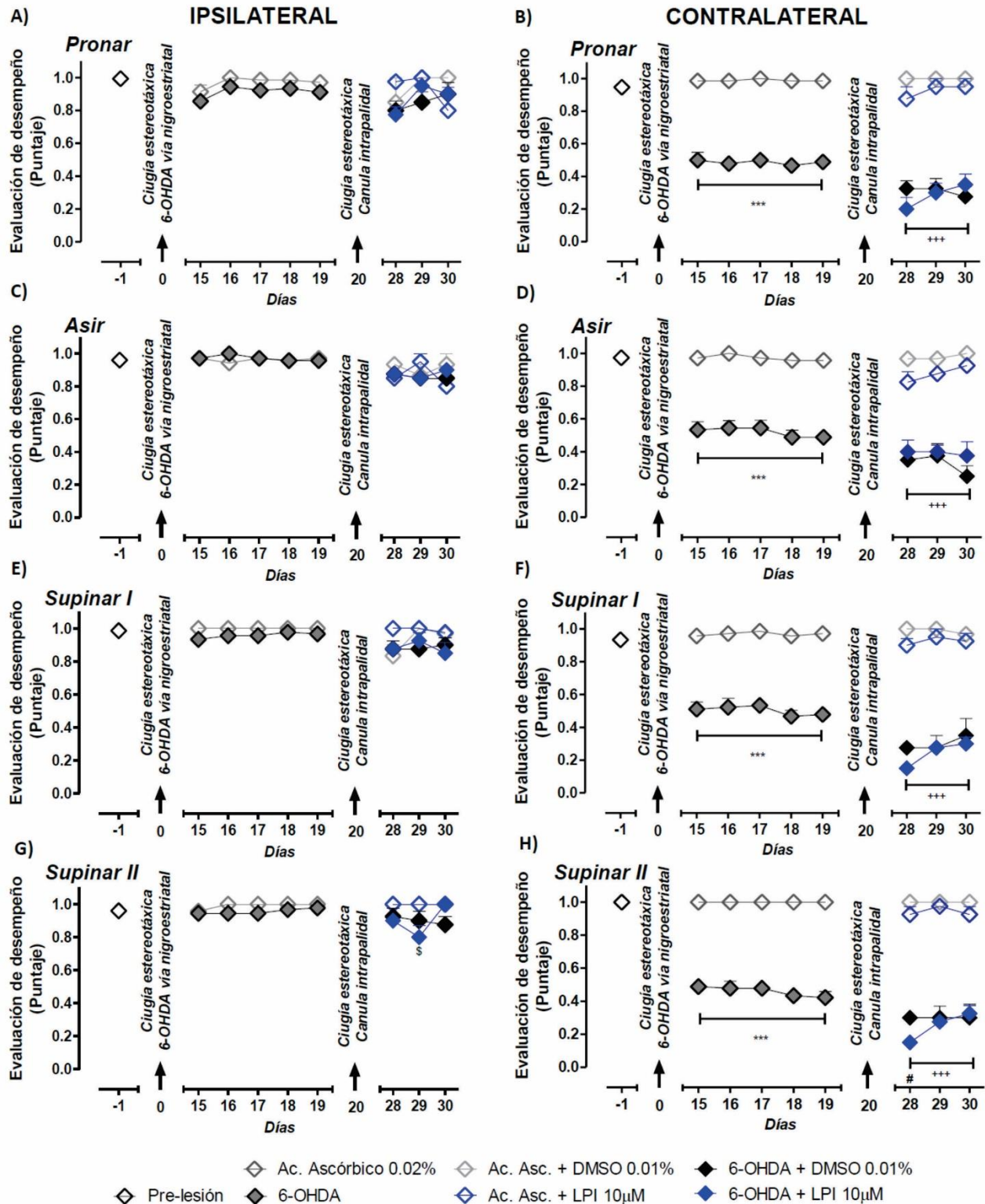


Figura 21. El agonismo del receptor GPR55 disminuye las habilidades motoras finas de ratas hemiparkinsonianas. Movimientos A) pronar, C) asir, E) supinar I, G) supinar II; ipsilateral. Movimientos B) pronar, D) asir, E) supinar I y supinar II; contralateral. Se evaluaron los grupos vehículo y 6-OHDA al día 19 post-lesión. Al día 30 post-cirugía se evaluaron los grupos formados por cada tratamiento farmacológico. Se muestra la media \pm el EEM, los datos fueron evaluados con una ANOVA de dos vías y una prueba post hoc Bonferroni. *** $p < 0.001$ vs Ac. Ascórbico 0.02%; +++ $p < 0.001$ vs Ac. Asc. + DMSO 0.01%; # $p < 0.05$ vs 6-OHDA+DMSO 0.01%. \$ $p < 0.05$ vs Ac. Asc + DMSO 0.01% (n=5-7 por grupo).

El análisis cuantitativo mostró una disminución significativa del movimiento pronar, asir, supinar I y supinar II del grupo 6-OHDA respecto al grupo control ($p < 0.001$) del día 15 al día 19 post-lesión. Después de la administración intrapalidal de LPI (día 28 al 30 post-lesión) se observó que los grupos 6-OHDA + DMSO y 6-OHDA + LPI mantienen una disminución de los cuatro movimientos finos con respecto al grupo Ac. Ascórbico + DMSO ($p < 0.001$) (Figura 21B, D, F, H). La evaluación de la extremidad ipsilateral a la lesión no mostró cambios estadísticamente significativos en ninguno de los movimientos evaluados durante el transcurso de la prueba (Figura 21A, C, E, G).

6.8. El antagonismo selectivo del receptor GPR55 mejora las habilidades motoras finas de ratas hemiparkinsonianas

El análisis cuantitativo mostró una disminución significativa del movimiento pronar, asir, supinar I y supinar II del grupo 6-OHDA respecto al grupo control ($p < 0.001$) del día 15 al día 19 post-lesión. Después de la administración intrapalidal de CID160 (día 28 al 30 post-lesión) se observó que el grupo 6-OHDA + CID160 mejora significativamente el desempeño de los cuatro movimientos finos respecto al grupo 6-OHDA + DMSO los días 28, 29, y 30 post-lesión (Figura 22B, D, F, H). La evaluación de la extremidad ipsilateral a la lesión de todos los grupos experimentales no mostraron cambios estadísticamente significativos en ninguno de los movimientos evaluados durante el transcurso de la prueba (Figura 22A, C, E, G).

6.9. La administración intrapalidal de Cannabidiol mejora las habilidades motoras finas de ratas hemiparkinsonianas

El análisis cuantitativo mostró una disminución significativa del movimiento pronar, asir, supinar I y supinar II del grupo 6-OHDA respecto al grupo control ($p < 0.001$) del día 15 al día 19 post-lesión. Después de la administración intrapalidal de CBD (día 28 al 30 post-lesión) se observó que el grupo 6-OHDA + CBD mejora significativamente el desempeño de los cuatro movimientos finos respecto al grupo 6-OHDA + DMSO (Figura 23B, D, F, H). La evaluación de la extremidad ipsilateral a la lesión de todos los grupos experimentales no mostraron cambios estadísticamente significativos en ninguno de los movimientos evaluados durante el transcurso de la prueba (Figura 23A, C, E, G).

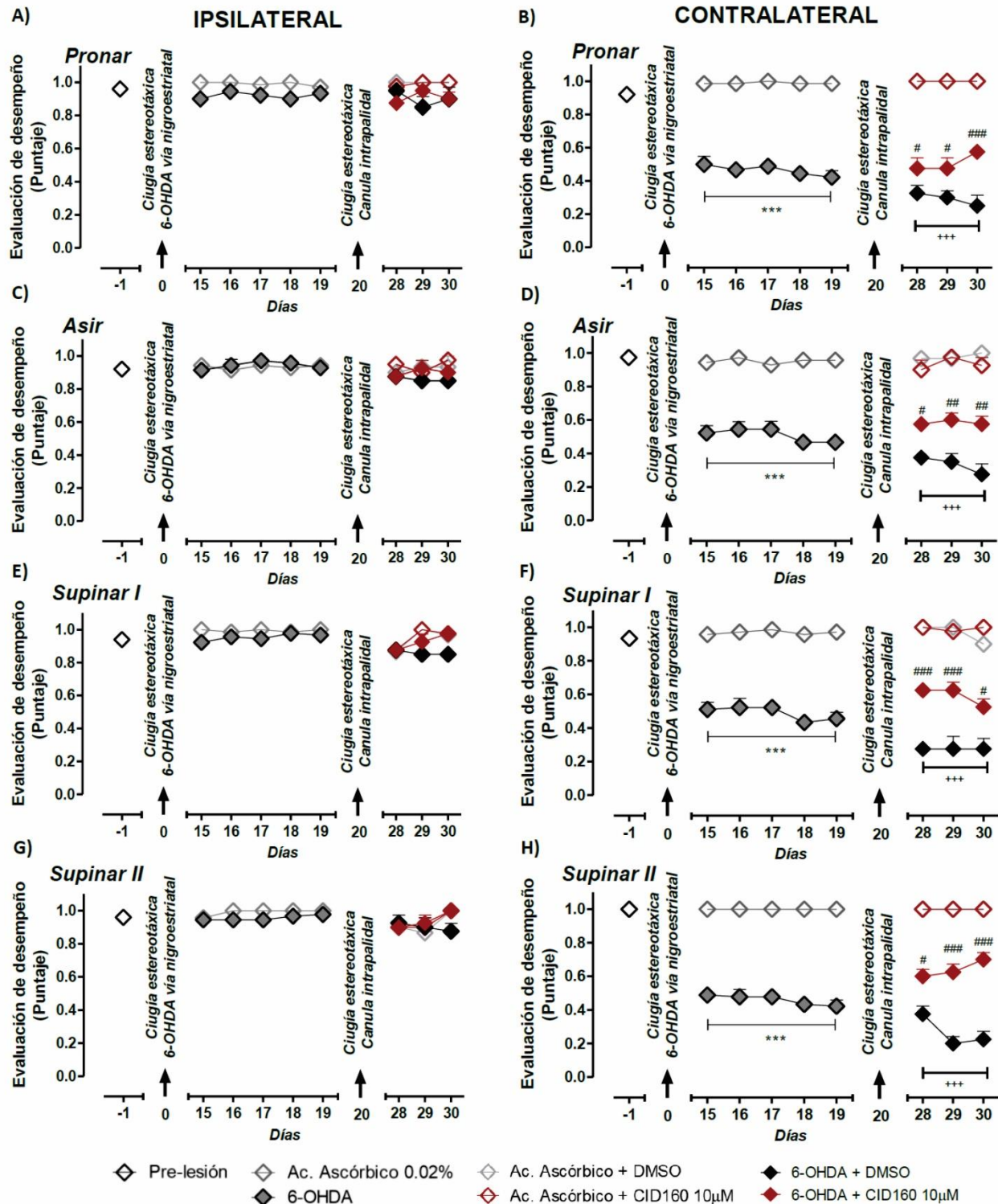


Figura 22. El antagonismo selectivo de GPR55 mejora las habilidades motoras finas de ratas hemiparkinsonianas. Movimientos A) pronar, C) asir, E) supinar I, G) supinar II, ipsilateral. Movimientos B) pronar, D) asir, E) supinar I y supinar II contralateral. Se evaluaron los grupos vehículo y 6-OHDA al día 19 post-lesión. Al día 30 post-cirugía se evaluaron los grupos formados por cada tratamiento farmacológico. Se muestra la media \pm el EEM, los datos fueron evaluados con una ANOVA de dos vías y una prueba post hoc Bonferroni. *** $p < 0.001$ vs Ac. Ascórbico 0.02%; +++ $p < 0.001$ vs Ac. Asc. + DMSO 0.01%; # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ vs 6-OHDA+DMSO 0.01%. (n=5-7 por grupo).

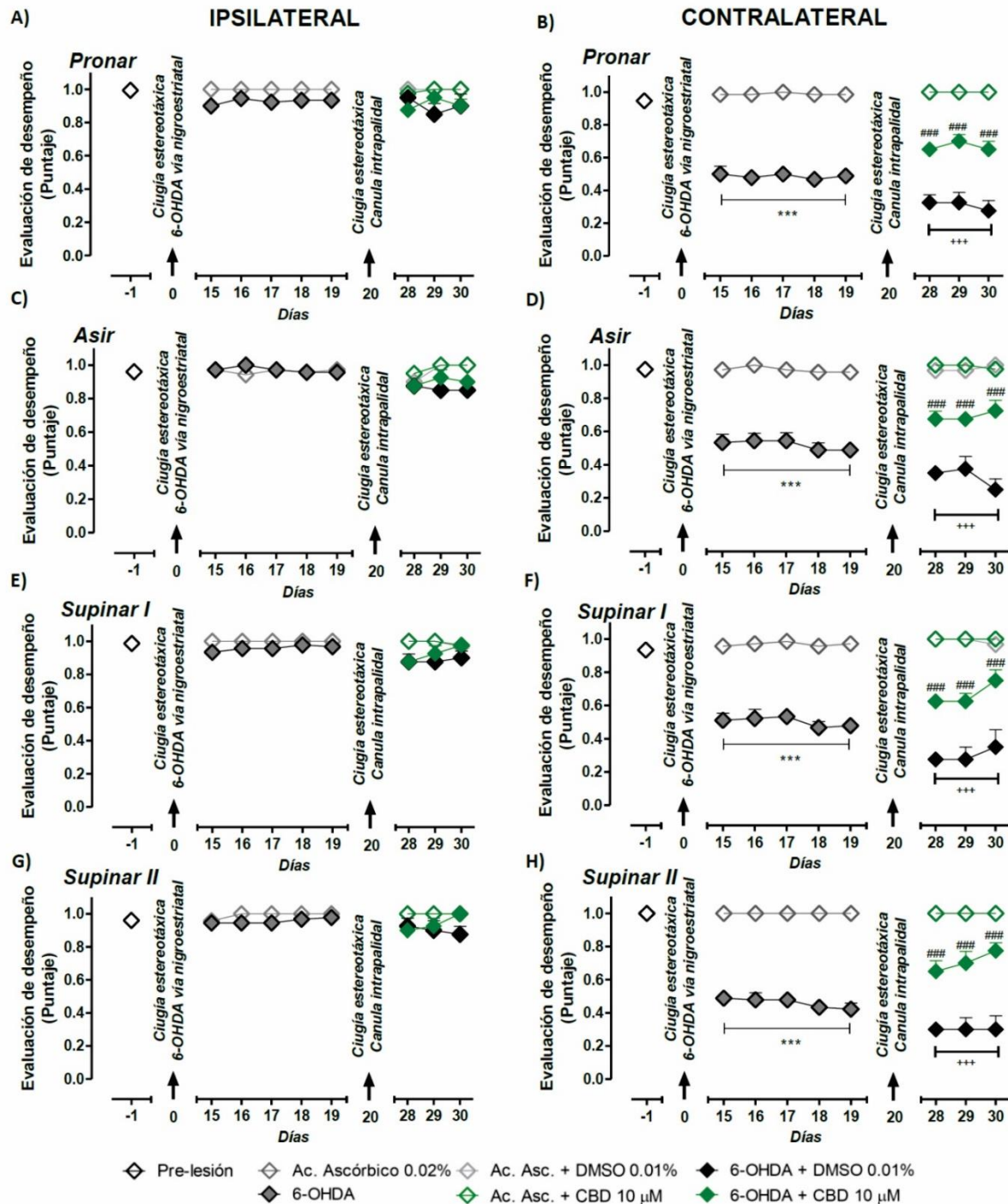


Figura 23. El agonismo inverso de GPR55 mejora las habilidades motoras finas de ratas hemiparkinsonianas. Movimientos A) pronar, C) asir, E) supinar I, G) supinar II, ipsilateral. Movimientos B) pronar, D) asir, E) supinar I y supinar II contralateral. Se evaluaron los grupos vehículo y 6-OHDA al día 19 post-lesión. Al día 30 post-cirugía se evaluaron los grupos formados por cada tratamiento farmacológico. Se muestra la media ± el EEM, los datos fueron evaluados con una ANOVA de dos vías y una prueba post hoc Bonferroni. *** $p < 0.001$ vs Ac. Ascórbico 0.02%; +++ $p < 0.001$ vs Ac. Asc. + DMSO 0.01%; ### $p < 0.001$ vs 6-OHDA+DMSO 0.01%. (n=5-7 por grupo).

Para evaluar la ejecución global del movimiento fino, se realizó la sumatoria de los 10 subcomponentes mostrados en la figura 24D. La evaluación de la extremidad ipsilateral de todos los grupos experimentales mostró un desempeño alto. Los días 15 al 19 mostraron que, el grupo 6-OHDA disminuyó en un 50.8% el desempeño global de la evaluación de la extremidad contralateral, respecto al grupo Ac. Ascórbico ($p < 0.001$). La evaluación del desempeño global de los días 28 al 30 post-lesión mostró que el agonismo del receptor GPR55 con LPI disminuye significativamente respecto al grupo Ac. Ascórbico + DMSO ($p < 0.001$) (Figura 24A). Por otra parte, el antagonismo selectivo con CID160 y el agonismo inverso con CBD mejoran significativamente el desempeño global del movimiento fino ($p < 0.001$, $p < 0.001$, respectivamente) (Figuras 24B y 24C).

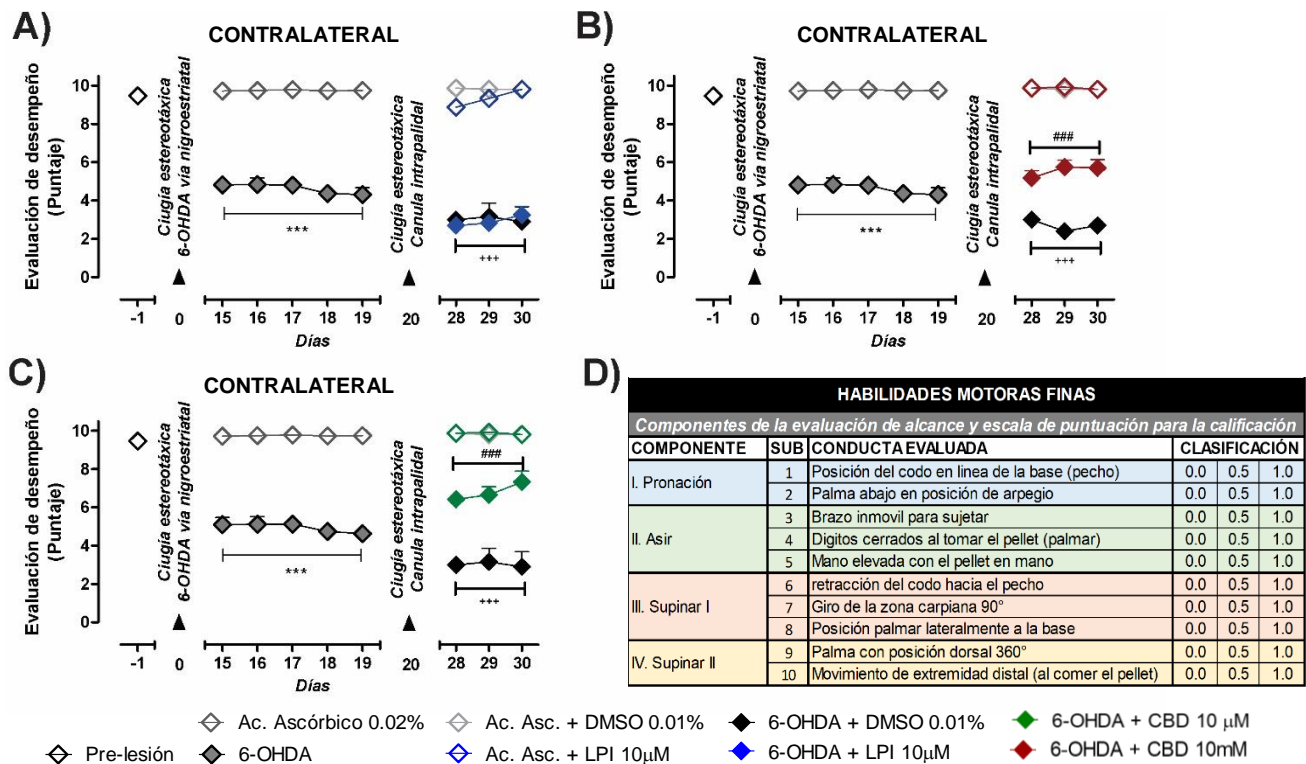


Figura 24. La inhibición del receptor GPR55 mejora las habilidades motoras finas de ratas hemiparkinsonianas.

A) Calificación total de las habilidades motoras finas de la extremidad contralateral con LPI 10 μM. B) Calificación total del movimiento fino con CID160 10 μM. C) Calificación total del movimiento fino con CBD 10 μM. D) Componentes de la evaluación de alcance y escala de puntuación para la calificación de las habilidades motoras finas. Se muestra la media ± el EEM, los datos fueron evaluados con una ANOVA de dos vías y una prueba post hoc Bonferroni. *** $p < 0.001$ vs Ac. Ascórbico 0.02%; +++ $p < 0.001$ vs Ac. Asc. + DMSO 0.01%; ### $p < 0.001$ vs 6-OHDA+DMSO 0.01%. (n=5-7 por grupo).

6.10. La administración de LPI, CBD o CID16020046 no altera la morfología del globo pálido de ratas hemiparkinsonianas

Se realizó tinción de Nissl para revelar la citoarquitectura y verificar la correcta colocación de la cánula en el núcleo de la GPe. La figura 25 muestra la colocación de la cánula en la zona dorsal del GPe, así como el trayecto de la cánula en la zona dorsal del GPe, no se observan alteraciones a nivel celular.

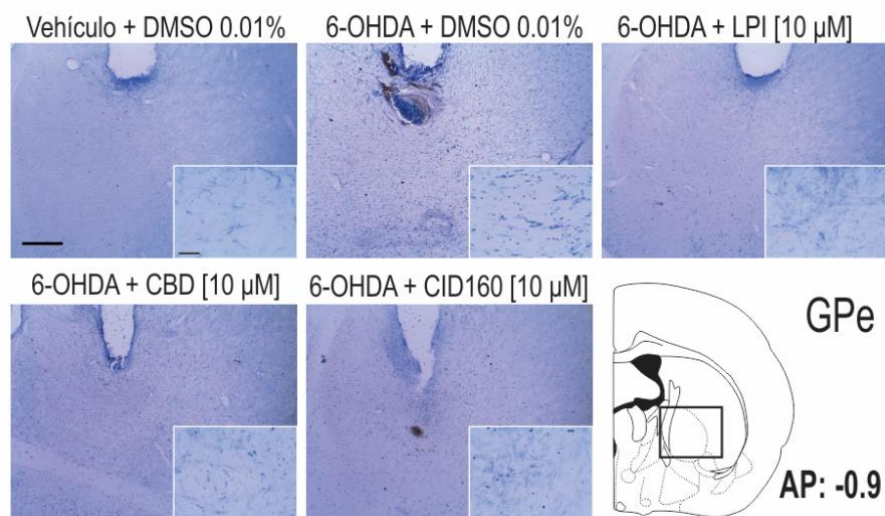


Figura 25. Morfología celular del GPe y la verificación del trayecto de la cánula guía. Las fotomicrografías muestran las células del GPe mediante la tinción de Nissl. Las fotografías se tomaron a 4x y 40x y la barra de escala representa 500 y 50 µm, respectivamente.

6.11. La administración de LPI, CBD o CID16020046 no modifica la expresión de tirosina hidroxilasa en el cuerpo estriado y sustancia negra pars compacta de ratas hemiparkinsonianas

Se realizó la inmunorreactividad para TH tanto en el cuerpo estriado como en la SNpc, con el fin de corroborar que la denervación dopaminérgica inducida por 6-OHDA se haya realizado de manera exitosa (Figura 26). Las gráficas que se muestran en las Figuras 26B y 26C muestran que el grupo 6-OHDA + DMSO presentó un menor porcentaje de área en el cuerpo estriado teñido para la enzima TH (11.6 ± 2.6 porcentaje de área teñida) y un menor número de células TH positivas en el SNpc (13.2 ± 5.0 número de células TH positivas) (Figura 26C) que el grupo de control (72.6 ± 5.0 porcentaje de

área teñida) (167.6 ± 12.1 número de células TH positivas), con una diferencia significativa de $p < 0.001$. No se encontraron diferencias entre los grupos experimentales 6-OHDA + LPI, 6-OHDA + CBD, 6-OHDA + CID16020046 tanto para el porcentaje de área teñida en el cuerpo estriado (15.3 ± 2.4 ; 14.7 ± 1.4 ; 13.5 ± 2.8 , respectivamente) como para el número de células TH positivas en la SNpc (16.2 ± 6.0 ; 14.4 ± 5.4 ; 13.2 ± 4.7 , respectivamente). Los hallazgos anteriores tienen similitud con los resultados obtenidos para el grupo 6-OHDA + DMSO.

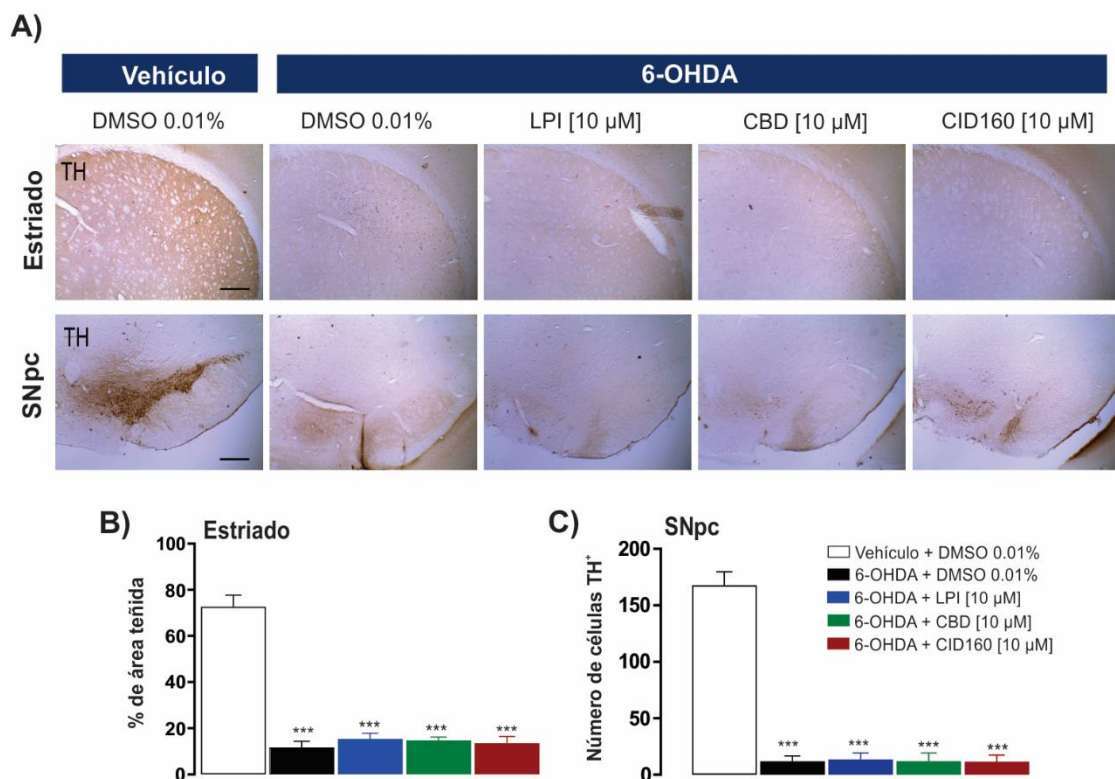


Figura 26. La administración de LPI, CBD y CID16020046 no modifica la expresión de TH en estriado y SNpc. Las fotomicrografías observadas en A) se muestran las imágenes representativas de la expresión para TH en el estriado ipsilateral a la lesión con 6-OHDA. Las fotomicrografías se tomaron a 40x, mientras que la barra representa 500 μm. En B) se muestra la proporción del área teñida para TH en el cuerpo estriado y en C) se muestra el número de células TH positivas en el SNpc. Se muestra la media \pm el EEM, los datos fueron evaluados con una ANOVA de una vía y una prueba post hoc Tukey. *** $p < 0.001$ vsvehículo (n=4 por grupo).

6.12. La inyección intrapálida de CBD o CID16020046 disminuye la expresión de GAD67 en el globo pálido externo y cuerpo estriado de ratas hemiparkinsonianas

Se midió la inmunorreactividad de GAD-67 en GPe, cuerpo estriado y SNpr (Figura 27A) con el fin de estudiar el efecto de la administración intrapalidal de LPI, CBD o CID16020046 sobre la toxicidad de 6-OHDA en las neuronas que expresan GAD-67. Los resultados obtenidos muestran que la expresión de GAD-67, en el estriado ipsilateral a la lesión (Figura 27B) y en el GPe ipsilateral, (Figura 27C), aumentó significativamente ($p < 0.01$ y $p < 0.001$, respectivamente) para el grupo de 6-OHDA + DMSO (82.3 ± 2.9 , 57.3 ± 1.7 porcentaje de área teñida) en comparación con el grupo de control (69.2 ± 2.7 , 42.8 ± 1.4 porcentaje de área teñida). Además, se observó un menor nivel de inmunorreactividad para GAD-67 en los grupos tratados con 6-OHDA + CBD y 6-OHDA + CID160 en el estriado (67.6 ± 2.2 , 68.7 ± 3.3 porcentaje de área teñida) y GPe (37.7 ± 3.3 , 42.7 ± 2.5 porcentaje de área teñida), con una diferencia de $p < 0.01$ y $p < 0.001$, respectivamente. El grupo 6-OHDA + LPI no mostró diferencias con el grupo 6-OHDA + DMSO, tanto en el cuerpo estriado (75.9 ± 2.3 porcentaje de área teñida) como en GPe (51.8 ± 2.0 porcentaje de área teñida).

La expresión de GAD-67 observada en el SNpr fue mayor para el grupo 6-OHDA + DMSO (37.1 ± 1.7 porcentaje de área teñida) que el grupo control (26.8 ± 2.1 porcentaje de área teñida) (Figura 27D). No se observaron diferencias entre los grupos experimentales 6-OHDA + LPI, 6-OHDA + CBD, 6-OHDA + CID16020046 para el porcentaje de área teñida para la enzima GAD-67 en la SNpr (33.5 ± 1.3 ; 27.4 ± 2.9 ; 30.0 ± 2.8 , respectivamente), hallazgos que contrastan con el grupo 6-OHDA + DMSO.

6.13. El lisofosfatidilinositol y el cannabindiol no modifican la expresión del receptor GPR55 en el estriado ipsilateral a la lesión

Dado que el LPI tiene una función de agonista y el CBD como agonista inverso, se procedió a evaluar la inmunorreactividad para el receptor GPR55 en el estriado dorsolateral e ipsilateral a la lesión. En la Figura 28A se muestra el panel de fotomicrografías donde se observa en color rojo (rodamina) la expresión del receptor GPR55 en el estriado. El análisis cuantitativo del porcentaje de área teñida del receptor

GPR55 no mostró una diferencia estadísticamente significativa en el grupo lesionado con 6-OHDA (30.8 ± 7.1) ni con la administración intrapalidal de LPI (48.4 ± 10.9) y CBD (46.1 ± 7.8) respecto al grupo Ac. Asc. + DMSO (56.5 ± 4.9) a nivel estriatal.

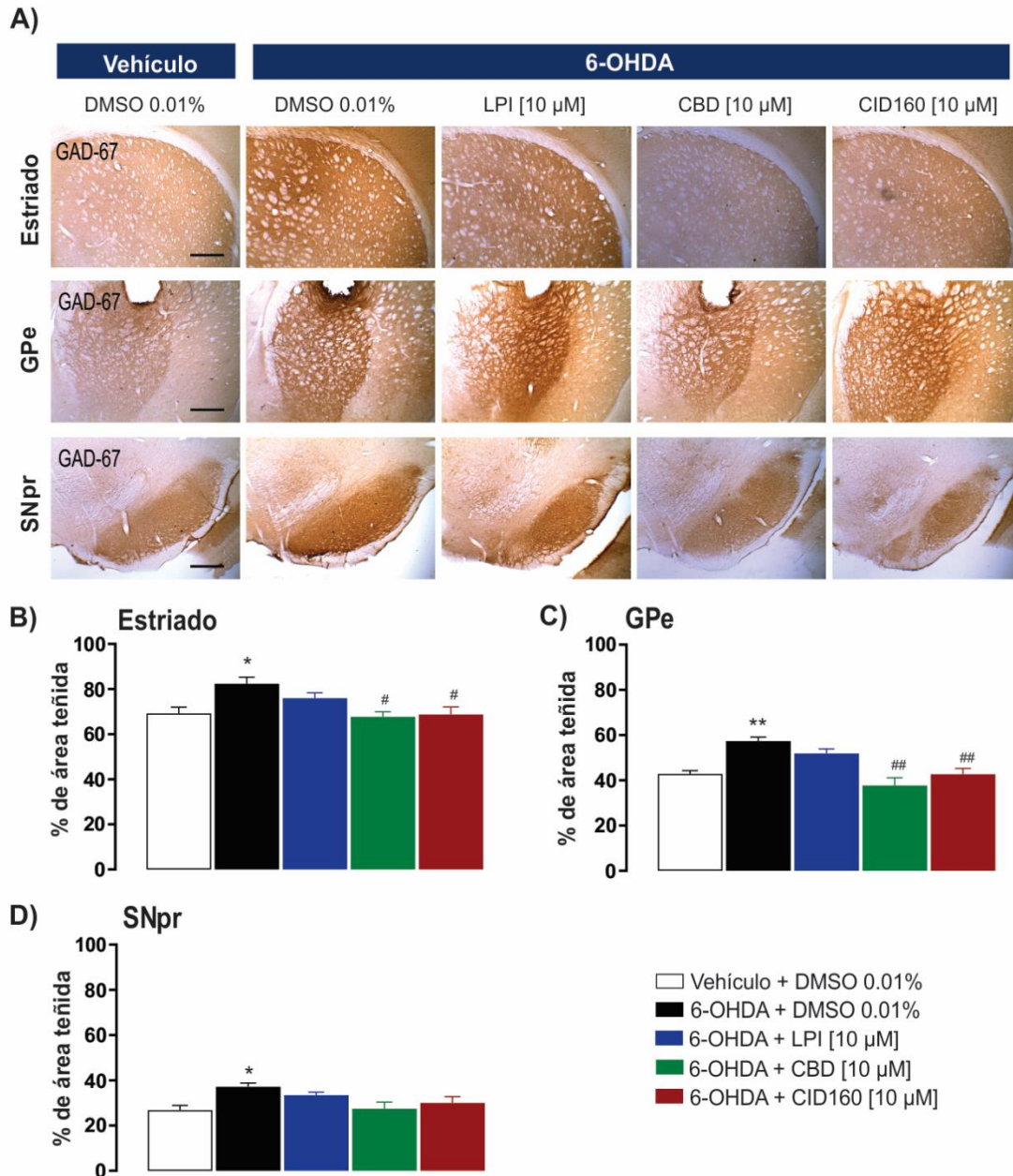


Figura 27. La administración de LPI, CBD y CID16020046 no modifica la expresión de TH en estriado y SNpc. Las fotomicrografías observadas en A) se muestran las imágenes representativas de la expresión para TH en el estriado ipsilateral a la lesión con 6-OHDA. Las fotomicrografías se tomaron a 40x, mientras que la barra representa 500 μ m. En B) se muestra la proporción del área teñida para TH en el cuerpo estriado y en C) se muestra el número de células TH positivas en el SNpc. Se muestra la media \pm el EEM, los datos fueron evaluados con una ANOVA de una vía y una prueba post hoc Tukey. *** $p < 0.001$ vsvehículo ($n=4$ por grupo).

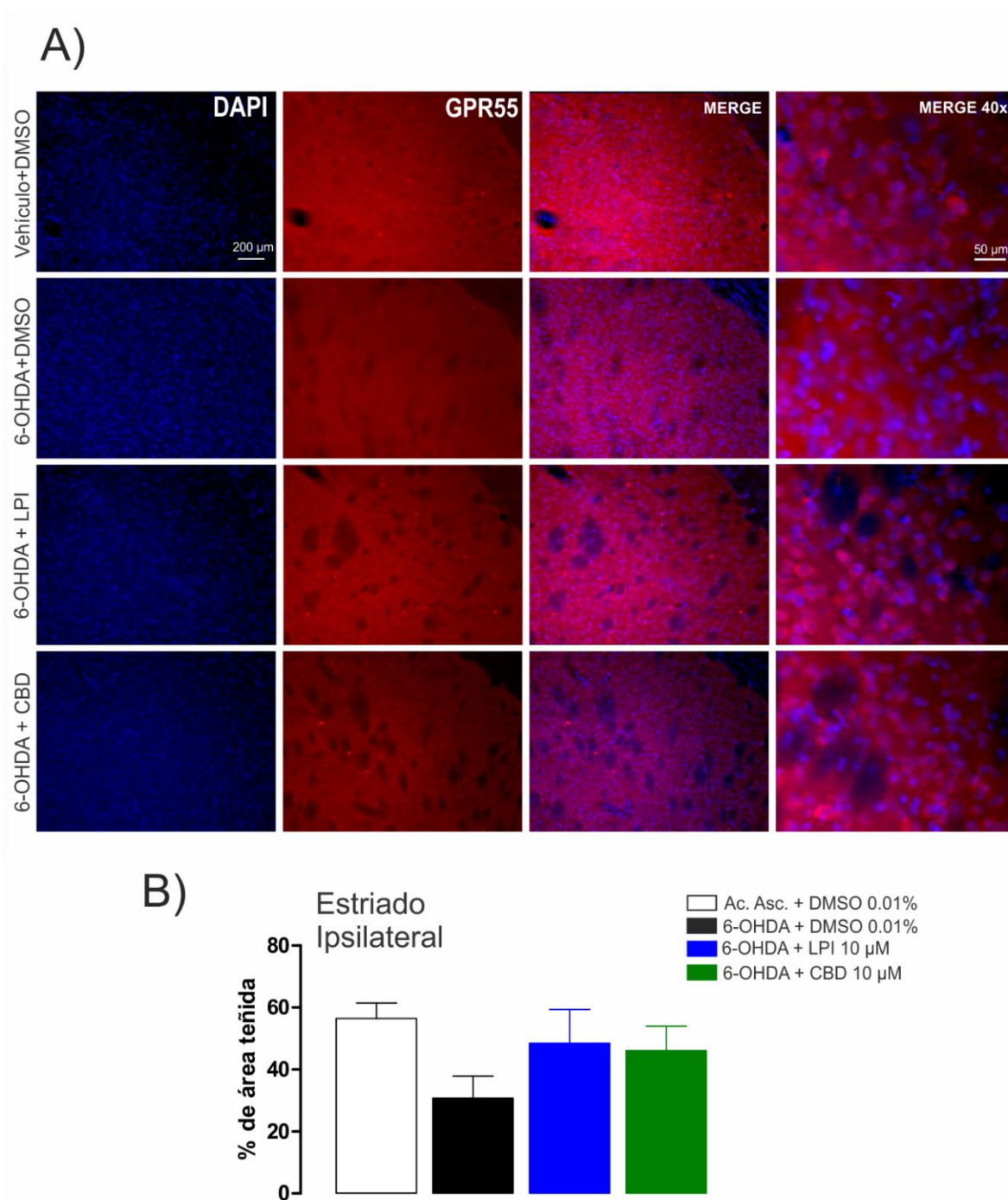


Figura 28. La administración intrapalidal de LPI 10 μ M o CBD10 μ M no modifican la expresión de GPR55 en estriado ipsilateral a la lesión de ratas hemiparkinsonianas.. A) Las fotomicrografías muestran la marca positiva para GPR55 (rojo), los núcleos se tiñeron con DAPI (azul) en la región dorsolateral del estriado ipsilateral a la lesión de cada uno de los grupos experimentales. B) Gráfica que muestra el porcentaje de área inmunoreactiva para GPR55. Se muestra la media \pm el EEM, los datos fueron evaluados con una ANOVA de una vía y una prueba post hoc Tuckey (n= 4 por grupo).

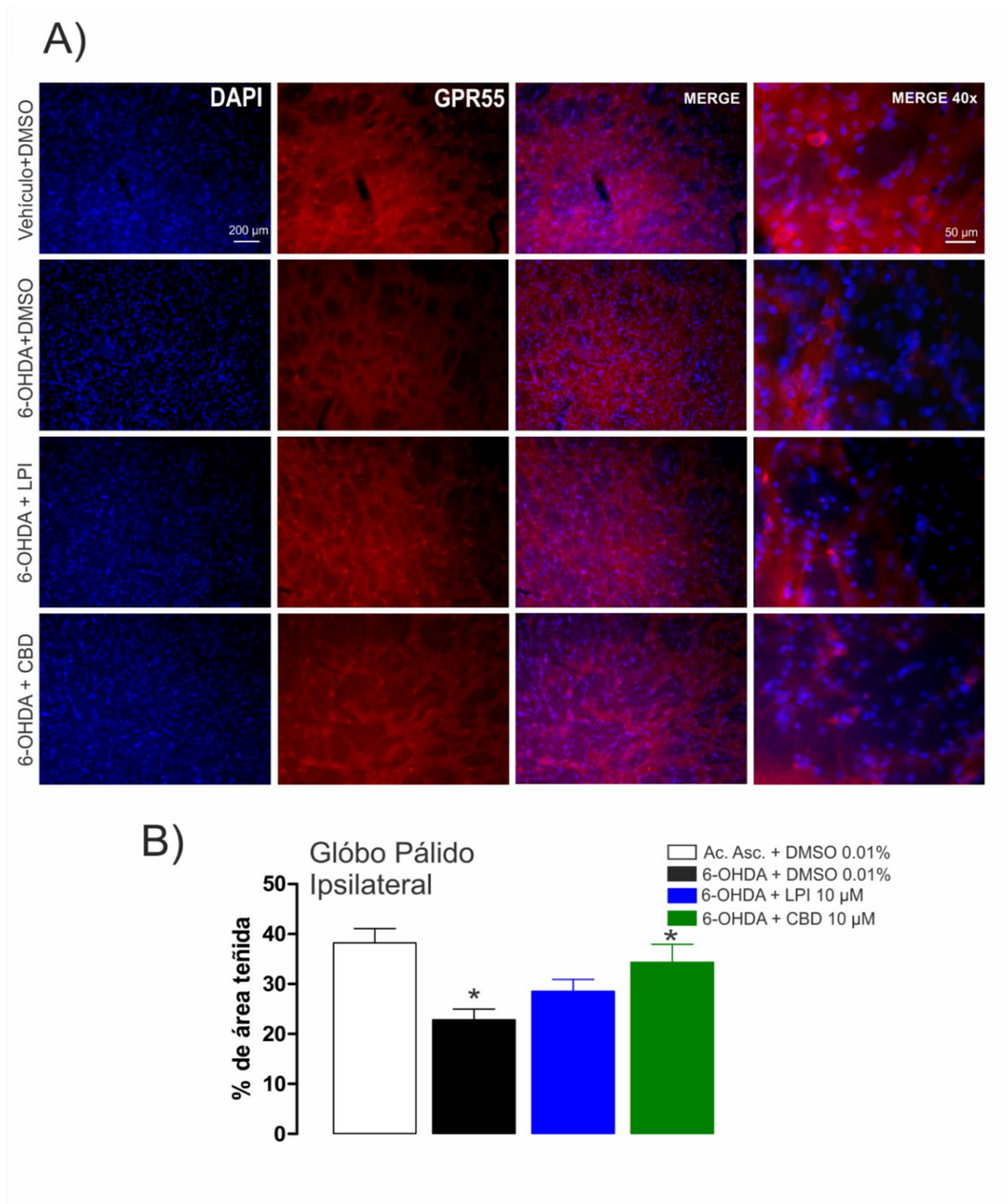


Figura 29. La administración intrapalidal de CBD 10 μM incrementa la expresión de GPR55 en el GPe ipsilateral a la lesión de ratas hemiparkinsonianas. A) Las fotomicrografías muestran la marca positiva para GPR55 (rojo), los núcleos se tiñeron con DAPI (azul) en la región dorsolateral del estriado ipsilateral a la lesión de cada uno de los grupos experimentales. B) Gráfica que muestra el porcentaje de área inmunoreactiva para GPR55. Se muestra la media ± el EEM, los datos fueron evaluados con una ANOVA de una vía y una prueba post hoc Tuckey. * $p < 0.05$ vs Ac. Asc. + DMSO 0.01% (n= 4 por grupo).

6.14. El cannabidiol incrementa la expresión del receptor GPR55 en el globo pálido externo ipsilateral a la lesión

Debido a que la administración de LPI y CBD fue en el GPe ipsilateral a la lesión, se procedió a evaluar la inmunorreactividad del receptor GPR55. En la Figura 3A se muestra el panel de fotomicrografías donde se muestra la expresión del receptor GPR55 (rodamina) en el GPe ipsilateral a la lesión. La Figura 1B muestra una disminución significativa ($p < 0.05$) en el porcentaje de área teñida del grupo 6-OHDA (22.8 ± 2.1) respecto al grupo Ac. Asc. + DMSO (38.2 ± 2.8). No se observaron diferencias estadísticas en los grupos 6-OHDA + LPI (28.5 ± 2.3), sin embargo, si se observó una diferencia ($p > 0.05$) entre el grupo 6-OHDA + CBD vs 6-OHDA (36.1 ± 3.2).

DISCUSIÓN

VII. DISCUSIÓN

El presente trabajo tuvo por objetivo estudiar las interacciones moleculares con tres ligandos tanto endógenos como exógenos para GPR55, los cuales fueron el lisofosfatidilinositol (LPI), el cannabidiol (CBD) y el CID16020046 (CID160). Así mismo se realizó el agonismo y antagonismo del receptor GPR55 a nivel intrapalidal en ratas hemiparkinsonianas, sobre las conductas motoras, especialmente la evaluación de la asimetría motora y las habilidades motoras finas. Por último, se evaluó la expresión del receptor GPR55, así como marcadores tanto dopaminérgicos como GABAérgicos; Tirosina hidroxilasa (TH) y Glutamato Descarboxilasa (GAD-67), respectivamente. Por lo tanto, uno de los primeros pasos fue la evaluación de la estructura molecular del receptor y sus sitios de interacción.

Se pudieron detectar tres sitios de interacción a través del modelamiento molecular y se pudo proponer el volumen del sitio ortostérico de GPR55 y, probablemente otros sitios adicionales que pudiesen desempeñar un rol alterno del receptor. Así mismo, se demostró que los tres ligandos utilizados; el LPI, el CBD y el CID160, muestran un mecanismo de interacción sobre el sitio ortostérico de GPR55 (Figura 16B). Se ha considerado que los sitios de unión de los receptores son cavidades superficiales de la proteína donde se puede unir un ligando (Cammisa et al., 2013) y estos sitios de unión podrían proponer nuevas dianas farmacológicas para el desarrollo de fármacos con bajo peso molecular (Chan et al., 2019). Para cumplir este objetivo, se utilizaron dos servidores computacionales que permitieron aportar datos sobre las características de los bolsillos de unión a ligandos de GPR55. El programa CASTp permitió evaluar las características volumétricas en función de la superficie molecular (Tabla 1). Probablemente este tipo de valoración sea una desventaja, debido a que el servidor propone volúmenes grandes en los sitios de unión que abarcan la mayor parte de los *loops* extracelulares. Eventualmente, esta premisa podría explicar los hallazgos obtenidos del presente estudio tal es el caso del gran volumen del sitio S1 con un valor de 4449.1 SM y, además el mayor número de aberturas (diez) que tuvo este sitio, respecto a S2 y S3. Sin embargo, CASTp, sigue siendo una herramienta ampliamente utilizada (Chung et al., 2019; Grinter and Lithgow, 2019; Oken et al., 2022) para tener una guía previa a los ensayos en los programas de

docking molecular, ya que estos solicitan características volumétricas del receptor para incrementar las posibilidades del acoplamiento del ligando con el receptor, tal es el caso de la caja (*grid box*) de Autodock vina (McCafferty et al., 2021; Seeliger and de Groot, 2010; Valdés-Tresanco et al., 2020).

Contrario a CASTp, el software DoGSiteScorer permitió evaluar los probables sitios de unión a ligandos en función del potencial farmacológico y en relación a los aminoácidos apolares. Se considera como potencial farmacológico, al potencial de una diana que pueda ser modulada por estructuras farmacológicas (Hopkins and Groom, 2002). De hecho, desde que inició la pandemia por el virus del SARS-CoV-2, se ha utilizado ampliamente esta herramienta computacional para determinar sitios de la estructura proteica *spike* del virus que tenga potencial farmacológico y así proponer dianas moleculares para el diseño de fármacos y nuevas estrategias terapéuticas (Drew and Janes, 2020; Kang et al., 2020). De este modo se definieron dos sitios de unión que se encuentran en la superficie extracelular del receptor. En la Tabla 2 Se muestra que el sitio S2 tiene un mayor volumen respecto a S1 y S3, además la relación de aminoácidos polares es mayor (0.58) en relación a los otros dos sitios. Debido a estas características, es probable que el sitio ortostérico del receptor sea el S2 y que el S1 pueda tener un rol como un sitio de unión alostérico. Es probable que existan sitios alostéricos, debido a que se han publicado reportes que proponen la existencia de un sitio de unión alostérico exclusivo para cannabinoides, puesto que este mecanismo podría explicar la inconsistente farmacología del receptor GPR55 (Anavi-Goffer et al., 2012; Rempel et al., 2013). Cabe mencionar que en el presente trabajo se realizó el acomplamiento molecular de un solo cannabinoide, el CBD, sin embargo, se observó que este cannabinoide interacciona en el sitio ortostérico del receptor. Es por ello que, son necesarios los estudios *in silico* para realizar propuestas para el desarrollo de mutaciones sitio dirigidas y demostrar la predicción por modelamiento molecular (Doss et al., 2014). Cabe mencionar que, hasta la fecha no se ha desarrollado un radioligando específico de GPR55 y que la proteína del receptor aún no se encuentra cristalizada (Alhouayek et al., 2018), por lo tanto, los hallazgos obtenidos son propuestas que podrían explicar los mecanismos farmacológicos de ligando-receptor.

Tanto con CASTp como con DoGSiteScorer determinaron un sitio S3 que se encontró en la zona basal del receptor y, que está expuesto a nivel intracelular. Se ha demostrado que los GPCR pueden tener una modulación a nivel intracelular en regiones aminoacídicas altamente conservadas y que estas regiones podrían modular o inhibir al receptor (Ortiz Zacarías et al., 2018; Shen et al., 2023). Existe nulo conocimiento sobre la existencia y funcionalidad de este presunto sitio de unión. Sin embargo, esta predicción molecular y con base a los reportes que demuestran un posible rol de un sitio de unión intracelular en los GPCR, es plausible sugerir el estudio sobre la novedosa señalización sesgada (Carr and Benovic, 2016; Gurevich and Gurevich, 2020; Smith et al., 2018), ya que este mecanismo ha sido propuesto para poder explicar las controversias farmacológicas de GPR55 (Alhouayek et al., 2018; Laprairie et al., 2017).

Existe poca información en la literatura sobre las interacciones intermoleculares entre LPI, CBD y CID160 con el receptor GPR55, por lo tanto, se realizó el acomplamiento o *docking* molecular de LPI, CBD y CID160. Se utilizó la secuencia aminoacídica de la especie *Rattus norvegicus* (rGPR55) para el modelamiento del receptor GPR55 y, con las características de los sitios de unión de GPR55, se buscó la interacción de los ligandos con S1, S2 y S3. Se encontraron dos interacciones de Cys en la estructura tridimensional del receptor, se formaron dos puentes disulfuro Cys168-Cys94 y Cys9-Cys260 (Figura 16A), mismos que se reportan en los modelamientos de GPR55 de *Homo sapiens* (hGPR55), donde la formación de puentes disulfuro se lleva a cabo en los residuos Cys168-Cys94 y Cys10-Cys260 (Kotsikorou et al., 2013). Así mismo, se demostró que las interacciones de CBD (agonista inverso) (Ryberg et al., 2007) y CID160 (agonista selectivo) (Brown et al., 2018) se realizaron sobre el sitio ortostérico para LPI (endógeno) (Oka et al., 2007; Oka et al., 2009). Probablemente, la inhibición selectiva provocada por CID160 y el agonismo inverso de CBD sea de manera competitiva (Chen et al., 2022; Ryberg et al., 2007). Un estudio sobre mutaciones sitio dirigidas evaluó a los aminoácidos involucrados en la activación del receptor GPR55, y se propuso que los residuos cruciales de dicha interacción y activación del receptor eran Tyr101, His170, Cys260 y Glu98, así como la consecuente activación de ERK (Lingerfelt et al., 2017). Nuestros resultados mostraron diferentes interacciones, sin embargo, con algunas similitudes. La interacción del hidroxilo C-4 del inositol de LPI formó un enlace de

hidrógeno con el residuo Cys168 de GPR55, así mismo se formó la interacción con Lys167. La formación de un enlace de LPI con un residuo de cisteína podría ser indicador de la estabilidad del ligante y la activación del receptor. Se debe resaltar que las secuencias homologas de los receptores hGPR55 y rGPR55 difieren en tamaño ya que poseen 319a y 336a, respectivamente (Baker et al., 2006).

Los resultados mostraron la interacción de los oxígenos del grupo fosfato de LPI formando un enlace de hidrógeno con el residuo LYS167 de GPR55, así mismo se formó la interacción con CYS168 con los grupos hidroxilo de LPI. Las características entre LYS167 (rGPR55) e HIS170 (hGPR55) son similares (Lingerfelt et al., 2017), debido a que pertenecen al grupo de aminoácidos con carga positiva y, por lo tanto, podría ser indispensable en la regulación de la activación del receptor. Es así que se propone que realizar mutaciones sitio dirigidas en Lys167 y Lys79 de rGPR55, ya que podría ser crucial para su activación y por lo tanto saber si son residuos indispensables para el estado conformacional del receptor. Se ha reportado la interacción de 2-araquidonil LPI (Elbegdorj et al., 2013) y a 1- α LPI (Kotsikorou et al., 2011) con Lys80 de hGPR55. En cuanto a los cannabinoides, se ha demostrado que CBD interacciona con los residuos aminoacídicos Thr166 (ECL2) (Bian et al., 2019) y Lys80 (Elbegdorj et al., 2013) de GPR55. Los resultados del presente trabajo muestran la predicción de la interacción de CBD con Glu98 de GPR55, sin embargo, se observan interacciones lipofílicas con Lys79 un aminoácido conservado en la secuencia de hGPR55 (Lys80). Por otra parte, se ha propuesto que el CBD podría funcionar como modulador alostérico negativo para GPR55 (Laprairie et al., 2015). Se han hecho acoplamientos y modelados computacionales de CBD y el receptor CB1 y muestran la probable interacción de otro sitio de unión cercano al TM1 y el loop N-terminal del receptor, diferente al sitio ortostérico (Chung et al., 2019). Debido a las características del receptor, así como sus interacciones con los ligandos estudiados, resultaron en una interacción en el sitio ortostérico del receptor, se decidió realizar los experimentos a nivel *in vivo*.

En el presente trabajo se realizó el agonismo y antagonismo del receptor GPR55 administrados directamente en el GPe de ratas hemiparkinsonianas sobre la asimetría motora y las actividades motoras finas. Por lo tanto, la asimetría motora fue evaluada con

la conducta de giro inducida por anfetamina y las habilidades motoras finas en el modelo de la escalera propuesto por Montoya y colaboradores (Montoya et al., 1991). Los resultados mostrados con la administración intrapalidal de LPI [10 μ M] en ratas hemiparkinsonianas, permitieron evidenciar el déficit motor en el modelo de la escalera y las habilidades motoras finas. Sin embargo, se observó una disminución en la conducta de giro inducido por anfetamina (Figura 17). Este hallazgo es de particular interés debido a las alteraciones reportadas en el circuito de los GB en estados parkinsonianos, especialmente con el incremento de la actividad GABAérgica en el GPe (Galvan et al., 2015; Galvan and Wichmann, 2008; Rubin et al., 2012). Los reportes que muestran la expresión del ARNm de GPR55 en los GB, mayoritariamente en el GPe, el NST y el estriado (Celorrio et al., 2017; Henstridge et al., 2011) y se plantea la hipótesis de que el receptor cumple un rol importante sobre el sistema de neurotransmisión GABAérgica. Por lo tanto, el agonismo de GPR55 con LPI incrementaría la liberación de GABA, como se ha observado con otros agonistas como la palmitoiletanolamina (Musella et al., 2017) en la vía nigro-estriatal (Fatemi et al., 2021) y en la vía estriado-nigral (Sánchez-Zavaleta et al., 2022). Es probable que los efectos observados en la disminución de la conducta de giro por la administración de LPI intrapalidal, sea adjudicada a la activación del receptor GPR55 expresado en las aferencias de otras poblaciones neuronales, tal es el caso del NST (Celorrio et al., 2017), esto se puede atribuir por los hallazgos encontrados sobre los impulsos nerviosos que recibe el GPe del núcleo estriado, NST y de la SNpc (Eid and Parent, 2016). Además, se ha demostrado que el NST tiene eferencias al GPe (Dong et al., 2021; Emmi et al., 2020; Kita and Kitai, 1987) y, que la modulación en ambos núcleos está fuertemente correlacionada en modelos parkinsonianos (Kovaleski et al., 2020). Por otro lado, existen implicaciones del sistema dopaminérgico en el GPe, mediante la activación del receptor D1 en la presinapsis del NST y la consecuente liberación de glutamato (Hernández et al., 2007; Villalba et al., 2015). Es entonces que, tanto las administraciones de LPI intrapalidal como la administración de anfetamina subcutánea en ratas hemiparkinsonianas, podrían modular el tono GABAérgico del GPe en función del tiempo como se observa en la Figura 17B en la evaluación en la conducta de giro.

La administración intrapalidal de CBD [10 μ M] mostró un efecto benéfico y más constante en la disminución de la conducta de giro de las ratas hemiparkinsonianas

(Figura 17B). Se sabe que, el CBD tiene diferentes dianas moleculares como el receptor CB1, CB2, la hidrolasa amida de ácidos grasos (FAAH), el receptor PPAR γ , el receptor A2A, el receptor 5-HT1A y el receptor GPR55 (de Almeida and Devi, 2020; Peres et al., 2018). Sin embargo, el efecto de CBD como agonista inverso de GPR55 ha sido ampliamente aceptado, así como su probable rol neuromodulador a nivel estriatal (Pandolfo et al., 2011). Se han demostrado los efectos negativos del CBD sobre el receptor GPR55 en la neurotransmisión glutamatérgica, adenosinérgica y dopaminérgica a nivel in vitro (Pandolfo et al., 2011; Ryberg et al., 2007; Sharir and Abood, 2010). Por lo tanto, el efecto de CBD en la disminución en la conducta de giro inducida por anfetamina no sólo debe ser interpretado con la interacción del receptor GPR55. Además, se ha demostrado la expresión y actividad de los receptores A2A (Diao et al., 2017), receptor 5-HT (Parent et al., 2011) y CB1 en el GPe (Chaves-Kirsten et al., 2013).

La evaluación de la asimetría motora en el modelo de la escalera se realizó con los siguientes parámetros: número de pellets comidos, número de pellets tomados y porcentaje de agarre exitoso (Figuras 18, 19 y 20). El modelo permite analizar la capacidad de agarre de la pata contralateral a la lesión. Por lo cual, los resultados pueden ser discernidos en tres objetivos: 1) la actividad y la motivación para alcanzar un objetivo (# de pellets tomados), 2) la habilidad de alcance y agarre (# de pellets comidos) y 3) la orientación o el acierto de todos los intentos de agarrar un pellet (% de agarre exitoso) (Klein et al., 2007). En el mismo modelo, se pudo realizar la evaluación de las habilidades motoras finas, que permite evidenciar de manera cualitativa, los movimientos pronar, asir, supinar I y supinar II. Con estos movimientos se puede determinar la calidad de agarre y el desempeño que realizan los animales para tomar el pellet de alimento (Metz and Whishaw, 2000).

Se observó que el agonismo de GPR55 en el GPe de rata hemiparkinsoniana provocó un déficit motor en la pata contralateral a la lesión en el modelo de la escalera (Figura 18) la motivación, la habilidad de agarre y los aciertos para agarrar un pellet fueron disminuidos. Este resultado es contrario a lo observado en la conducta de giro debido a que el agonismo de GPR55 con LPI en el GPe, ya que disminuyó el número de giros ipsilaterales a la lesión (Figura 17B); es probable que la diferencia entre las dos

conductas, sea por la dopamina liberada inducida por la administración de anfetamina. Por otra parte, se pudo evidenciar la disminución en las habilidades motoras finas de las ratas lesionadas con 6-OHDA y, también en las ratas con la administración intrapalidal a los días 28, 29 y 30 (Figura 21). Estos hallazgos probablemente se deben a las bajas concentraciones de dopamina biodisponible en la vía nigro-estriatal y nigropalidal (Benazzouz et al., 2014; Galvan et al., 2001; Rajput et al., 2008). Por lo que, la ausencia de dopamina provocaría una disminución en la señalización del receptor D2, y además esto conllevaría a un incremento del tono GABAérgico estriado-palidal y nigro-palidal. Por consiguiente, el incremento de GABA en las neuronas palidales podría conducir a la hiperpolarización neuronal de la vía palido-subtalámica y, esto se puede traducirse en una sobreactivación de las neuronas glutamatergicas hacia los núcleos de salida de los GB, promoviendo así la hipocinesia (Lanciego et al., 2012; Rubin et al., 2012).

A nivel celular, se ha demostrado que el receptor GPR55 puede activar la vía de señalización ROCK y/o PLC e inducir la liberación de Ca^{2+} intracelular en las neuronas GABAérgicas del GPe. Sin embargo, este mecanismo se ha reportado solamente en neuronas hipocámpales (Sylantsev et al., 2013) y en neuronas de los ganglios de la raíz dorsal (Lauckner et al., 2008), por lo que se propone que podría suceder también en las neuronas GABAérgicas por la activación de GPR55 (Musella et al., 2017). La consecuente liberación de Ca^{2+} intracelular en las neuronas GABAérgicas llevaría a cabo la despolarización neuronal, lo que podría repercutir en una inhibición en la liberación de GABA y en la disminución de la hipocinesia, como se observa en otros estudios (Chadha et al., 2000; Mallet et al., 2019). Nuestros hallazgos a nivel farmacológico proponen que la activación de GPR55 en el GPe genera un incremento en el déficit motor y/o la hipocinesia, muy similar con reportes de la administración de LPI en el estriado de ratas hemiparkinsonianas (Fatemi et al., 2021) y, este proceso solamente se relaciona con el incremento de GABA en la vía estriado-palidal (Galvan et al., 2005). Además, es probable que la vía indirecta del circuito de los GB participe en la inhibición del movimiento fino (Yin et al., 2009). Sin embargo, se necesita realizar experimentos a nivel neuroquímico y determinar el efecto de los ligandos sobre la liberación, recaptura y concentración de GABA extracelular para llegar a esta conclusión.

Con respecto al antagonismo y agonismo inverso del receptor GPR55 (Figuras 19 y 20) mostraron mejoras en la asimetría motora de ratas hemiparkinsonianas y, una mejoría en las habilidades motoras finas de la extremidad contralateral respecto al grupo 6-OHDA + DMSO (Figuras 22 y 23). Curiosamente no hubo diferencias en el número de pellets tomados (la actividad y la motivación para alcanzar un objetivo), sin embargo, si incrementó el número de pellets comidos (habilidad de alcance), y además hubo un incremento en el porcentaje de agarre exitoso; el resultado entre la motivación y la habilidad de agarre. Estos datos permiten evidenciar que el antagonismo de GPR55 mejora la calidad de agarre en ratas hemiparkinsonianas y podría estar relacionado con la liberación del neurotransmisor (Marichal-Cancino et al., 2017; Marichal-Cancino et al., 2016). Por otra parte, el CBD incrementó el porcentaje de agarre exitoso de manera similar a los grupos controles. Este hallazgo podría sugerir el mecanismo modulador del fitocannabinoide, debido a que a los 30 días de lesión con 6-OHDA, un porcentaje mayor de neuronas dopaminérgicas en la vía nigroestriatal se han degenerado y el papel neuroprotector de CBD es nulo (García-Arencibia et al., 2007). Los hallazgos sobre la asimetría motora y las habilidades motoras finas permitieron evidenciar el probable papel del receptor GPR55 como neuromodulador en el GPe en ratas hemiparkinsonianas.

Por otra parte, se realizó la tinción de Nissl que permite visualizar la conformación neuronal (Martin et al., 2003) y además se observó el trayecto de la canula al sitio de interés, el GPe. De la misma manera, se demostró la inmunorreactividad para la enzima TH en la SNpc y Estriado, así como para el receptor GPR55 en los núcleos del estriado y el GPe (vía indirecta) con la inyección intrapalidal por tres días consecutivos (28, 29 y 30 días pos-lesión) de LPI 10 μ M o CBD 10 μ M en ratas hemiparkinsonianas. Se sabe muy bien que, la actividad neuronal GABAérgica de la vía estriado-palidal se encuentra sobreactivada en estados parkinsonianos (Galeffi et al., 2003; Jamwal and Kumar, 2019) por lo que nuestros resultados también mostraron un incremento en la expresión de la GAD-67 tanto en GPe como en el estriado, mismos que fueron revertidos por el CBD y CID160. Este hallazgo sustenta aún más que el receptor GPR55 podría tener una modulación directa sobre el sistema GABAérgico de la vía estriado-palidal. Curiosamente en la SNpr se observó un incremento significativo en la expresión de GAD-67, pero los fármacos no tuvieron ningún efecto sobre el núcleo, lo que puede ser explicado por la

administración local de LPI, CBD y CID160. Un trabajo reciente mostró que la inyección directa de LPI en la SNpr induce un incremento en la recaptura y la liberación de GABA y además disminuye la conducta de giro (Sánchez-Zavaleta et al., 2022), confirmando el modelo clásico de Albin y colaboradores sobre los mecanismos opuestos de la vía directa e indirecta (Albin et al., 1989).

Debido a que la inducción de la denervación dopaminérgica con 6-OHDA en la vía nigroestriatal en modelos animales incrementa el tono GABAérgico de la vía estriado-palidal (Kita and Kita, 2011; Obeso et al., 2004) y además provoca la degeneración rápida y generalizada tanto en el estriado como en la SNpc (>90 % de muerte neuronal dopaminérgica) (Yuan et al., 2005) se pudo determinar que los fármacos realizaron sus efectos en ausencia del tono dopaminérgico. En la Figura 26 se muestra la disminución de la inmunoreactividad a TH en la SNpc y el estriado en los grupos experimentales lesionados con 6-OHDA y, por lo tanto, se puede concluir que el efecto de la administración de LPI o CBD, es independiente de la actividad dopaminérgica en el GPe. Por lo que, dada la severidad de la lesión, no se esperaba algún tipo de modificación en la expresión de la enzima.

Por otro lado, era necesario evidenciar la expresión proteica del receptor GPR55 en vía estriado-palidal. La expresión del ARNm tanto en el estriado como en el GPe (Celorrio et al., 2017) permitió que se hipotetizara que el receptor se localizaba en las terminales sinápticas del estriado. En la Figura 27 y 28, se muestra la inmunoreactividad del receptor GPR55 en el estriado y el GPe, respectivamente. A pesar de que no se ha demostrado la expresión proteica del receptor en neuronas GABAérgicas, la inmunoreactividad es muy similar en neuronas glutamatérgicas del hipocampo y corteza (Hurst et al., 2017; Shi et al., 2017). La localización se observa en el cuerpo neuronal, así como ligeros puntilleos alrededor del soma (Hurst et al., 2017). Es necesario enfatizar la observación de la disminución del porcentaje de área teñida de la expresión del receptor GPR55 en el grupo lesionado con 6-OHDA + DMSO, ya que es muy probable que exista una relación en la señalización dopaminérgica y la modulación en la expresión del receptor GPR55. Se pudo observar una down regulation del ARNm del receptor GPR55 en el cuerpo estriado de un ratón parkinsoniano inducido con el 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-

tetrahidropiridina (MPTP) y se propuso que el receptor puede estar probablemente involucrado en la patología de la EP (Celorrio et al., 2017). Sin embargo, en el presente trabajo, la diferencia estadística solo se observó en el GPe del grupo con 6-OHDA + DMSO, lo que puede sugerir que la disminución de dopamina y su señalización podría afectar la síntesis del receptor GPR55 en el GPe.

El efecto de CBD sobre el receptor GPR55 en el GPe de rata hemiparkinsoniana fue satisfactoria ya que incremento su expresión. Se ha demostrado a nivel in vitro en células CHO (chinese hamster ovary) que la internalización del receptor puede estar mediado por clatrina (Mangini et al., 2017). En otro estudio se demostró que la administración de 2.5 μ M de LPI y 2.5 μ M de rimonabant en células HEK293 indujo la internalización del receptor y la probable participación de GASP-1 (GPCR-associated sorting protein 1) (Kargl et al., 2012). Es probable que la concentración de los fármacos pueda ser crítica en la expresión del receptor, por otra parte, no se han estudiado las modificaciones de la expresión y probable internalización del receptor en diferentes áreas cerebrales y su probable repercusión en la señalización, tal es el caso de la activación de β -arrestina cuando se administran ligandos para GPR55 (Kapur et al., 2009).

CONCLUSIONES

1. De los tres sitios obtenidos por modelamiento molecular, el sitio de unión S2 tiene las propiedades del sitio ortostérico del receptor GPR55.
2. El lisofosfatidilinositol, el CID16020046 y el Cannabidiol, comparten el mismo sitio de unión ortostérico de GPR55 en relación con las predicciones del docking molecular.
3. El agonismo del receptor GPR55 con LPI [10 μ M] en el GPe de ratas hemiparkinsonianas no modifica el déficit motor en el modelo de la escalera
4. El antagonismo selectivo del receptor GPR55 con CID16020046 [10 μ M] en el GPe de ratas hemiparkinsonianas disminuye la asimetría motora en el modelo de la escalera y mejora las habilidades motoras finas.
5. El agonismo inverso del receptor GPR55 con CBD [10 μ M] en el GPe de rata hemiparkinsoniana disminuye la asimetría motora en el modelo de la escalera y mejora las habilidades motoras finas.
6. La administración intrapalidal de LPI [10 μ M], de CID16020046 [10 μ M] y de CBD [10 μ M] no modifican la expresión de Tirosina hidroxilasa tanto en estriado como en SNpc de ratas hemiparkinsonianas.
7. La administración intrapalidal de CID16020046 [10 μ M] y de CBD [10 μ M] incrementan la expresión de GAD-67 en estriado y GPe de ratas hemiparkinsonianas.
8. La administración intrapalidal de CBD [10 μ M] incrementan la expresión de GPR55 en el GPe de ratas hemiparkinsonianas.

PERSPECTIVAS

1. Evaluar el efecto de la administración intrapalidal de CBD [10 μ M] y de CID16020046 [10 μ M] sobre la liberación y recaptura de GABA en sinaptosomas de estriado y GPe de ratas hemiparkinsonianas.
2. Evaluar el efecto de la administración intrapalidal de CBD [10 μ M] y de CID16020046 [10 μ M] sobre la expresión de GAT1 y GAT3 en estriado, GPe y células gliales de ratas hemiparkinsonianas.
3. Evaluar el efecto de la administración intrapalidal de CBD 10 μ M] y de CID16020046 [10 μ M] sobre la vía de señalización ROCK y la expresión de las proteínas rac1 y RhoA en estriado y GPe de ratas hemiparkinsonianas.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

- Albin, R. L., Young, A. B. & Penney, J. B. (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci*, 12(10), 366-75. 10.1016/0166-2236(89)90074-x.
- Alhouayek, M., Masquelier, J. & Muccioli, G. G. (2018) Lysophosphatidylinositols, from Cell Membrane Constituents to GPR55 Ligands. *Trends Pharmacol Sci*, 39(6), 586-604. 10.1016/j.tips.2018.02.011.
- Anavi-Goffer, S., Baillie, G., Irving, A. J., Gertsch, J., Greig, I. R., Pertwee, R. G. & Ross, R. A. (2012) Modulation of L- α -lysophosphatidylinositol/GPR55 mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling by cannabinoids. *J Biol Chem*, 287(1), 91-104. 10.1074/jbc.M111.296020.
- Azdad, K., Chávez, M., Don Bishop, P., Wetzelaer, P., Marescau, B., De Deyn, P. P., Gall, D. & Schiffmann, S. N. (2009) Homeostatic plasticity of striatal neurons intrinsic excitability following dopamine depletion. *PLoS One*, 4(9), e6908. 10.1371/journal.pone.0006908.
- Baker, D., Pryce, G., Davies, W. L. & Hiley, C. R. (2006) In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol Sci*, 27(1), 1-4. 10.1016/j.tips.2005.11.003.
- Benazzouz, A., Mamad, O., Abedi, P., Bouali-Benazzouz, R. & Chetrit, J. (2014) Involvement of dopamine loss in extrastriatal basal ganglia nuclei in the pathophysiology of Parkinson's disease. *Front Aging Neurosci*, 6, 87. 10.3389/fnagi.2014.00087.
- Bian, Y. M., He, X. B., Jing, Y. K., Wang, L. R., Wang, J. M. & Xie, X. Q. (2019) Computational systems pharmacology analysis of cannabidiol: a combination of chemogenomics-knowledgebase network analysis and integrated in silico modeling and simulation. *Acta Pharmacol Sin*, 40(3), 374-386. 10.1038/s41401-018-0071-1.
- Blandini, F. & Armentero, M. T. (2012) Animal models of Parkinson's disease. *FEBS J*, 279(7), 1156-66. 10.1111/j.1742-4658.2012.08491.x.

- Bolam, J. P., Hanley, J. J., Booth, P. A. & Bevan, M. D. (2000) Synaptic organisation of the basal ganglia. *J Anat*, 196 (Pt 4)(Pt 4), 527-42. 10.1046/j.1469-7580.2000.19640527.x.
- Borden, L. A. (1996) GABA transporter heterogeneity: pharmacology and cellular localization. *Neurochem Int*, 29(4), 335-56. 10.1016/0197-0186(95)00158-1.
- Brown, A. J., Castellano-Pellicena, I., Haslam, C. P., Nichols, P. L. & Dowell, S. J. (2018) Structure-Activity Relationship of the GPR55 Antagonist, CID16020046. *Pharmacology*, 102(5-6), 324-331. 10.1159/000493490.
- Calebiro, D., Koszegi, Z., Lanoiselée, Y., Miljus, T. & O'Brien, S. (2021) G protein-coupled receptor-G protein interactions: a single-molecule perspective. *Physiol Rev*, 101(3), 857-906. 10.1152/physrev.00021.2020.
- Cammisa, M., Correria, A., Andreotti, G. & Cubellis, M. V. (2013) Identification and analysis of conserved pockets on protein surfaces. *BMC Bioinformatics*, 14 Suppl 7(Suppl 7), S9. 10.1186/1471-2105-14-S7-S9.
- Carr, R. & Benovic, J. L. (2016) From biased signalling to polypharmacology: unlocking unique intracellular signalling using pepducins. *Biochem Soc Trans*, 44(2), 555-61. 10.1042/BST20150230.
- Celorrio, M., Rojo-Bustamante, E., Fernández-Suárez, D., Sáez, E., Estella-Hermoso de Mendoza, A., Müller, C. E., Ramírez, M. J., Oyarzábal, J., Franco, R. & Aymerich, M. S. (2017) GPR55: A therapeutic target for Parkinson's disease? *Neuropharmacology*, 125, 319-332. 10.1016/j.neuropharm.2017.08.017.
- Chadha, A., Sur, C., Atack, J. & Duty, S. (2000) The 5HT(1B) receptor agonist, CP-93129, inhibits [(3)H]-GABA release from rat globus pallidus slices and reverses akinesia following intrapallidal injection in the reserpine-treated rat. *Br J Pharmacol*, 130(8), 1927-32. 10.1038/sj.bjp.0703526.
- Chan, H. C. S., Li, Y., Dahoun, T., Vogel, H. & Yuan, S. (2019) New Binding Sites, New Opportunities for GPCR Drug Discovery. *Trends Biochem Sci*, 44(4), 312-330. 10.1016/j.tibs.2018.11.011.
- Chaves-Kirsten, G. P., Mazucanti, C. H., Real, C. C., Souza, B. M., Britto, L. R. & Torrão, A. S. (2013) Temporal changes of CB1 cannabinoid receptor in the basal

- ganglia as a possible structure-specific plasticity process in 6-OHDA lesioned rats. *PLoS One*, 8(10), e76874. 10.1371/journal.pone.0076874.
- Chen, R., Xu, H., Guo, Z., Zhang, P., Chen, J. & Chen, Z. (2022) CID16020046, a GPR55 antagonist, attenuates sepsis-induced acute kidney injury. *Mol Med Rep*, 25(5). 10.3892/mmr.2022.12671.
 - Chiurchiù, V., Lanuti, M., De Bardi, M., Battistini, L. & Maccarrone, M. (2015) The differential characterization of GPR55 receptor in human peripheral blood reveals a distinctive expression in monocytes and NK cells and a proinflammatory role in these innate cells. *Int Immunol*, 27(3), 153-60. 10.1093/intimm/dxu097.
 - Chung, H., Fierro, A. & Pessoa-Mahana, C. D. (2019) Cannabidiol binding and negative allosteric modulation at the cannabinoid type 1 receptor in the presence of delta-9-tetrahydrocannabinol: An In Silico study. *PLoS One*, 14(7), e0220025. 10.1371/journal.pone.0220025.
 - Chung, S., Funakoshi, T. & Civelli, O. (2008) Orphan GPCR research. *Br J Pharmacol*, 153 Suppl 1(Suppl 1), S339-46. 10.1038/sj.bjp.0707606.
 - Cristino, L., Bisogno, T. & Di Marzo, V. (2020) Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nat Rev Neurol*, 16(1), 9-29. 10.1038/s41582-019-0284-z.
 - Davenport, A. P., Alexander, S. P., Sharman, J. L., Pawson, A. J., Benson, H. E., Monaghan, A. E., Liew, W. C., Mpamhanga, C. P., Bonner, T. I., Neubig, R. R., Pin, J. P., Spedding, M. & Harmar, A. J. (2013) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXVIII. G protein-coupled receptor list: recommendations for new pairings with cognate ligands. *Pharmacol Rev*, 65(3), 967-86. 10.1124/pr.112.007179.
 - de Almeida, D. L. & Devi, L. A. (2020) Diversity of molecular targets and signaling pathways for CBD. *Pharmacol Res Perspect*, 8(6), e00682. 10.1002/prp2.682.
 - Deumens, R., Blokland, A. & Prickaerts, J. (2002) Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp Neurol*, 175(2), 303-17. 10.1006/exnr.2002.7891.

- Deutch, A. Y., Colbran, R. J. & Winder, D. J. (2007) Striatal plasticity and medium spiny neuron dendritic remodeling in parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord*, 13 Suppl 3(Suppl 3), S251-8. 10.1016/S1353-8020(08)70012-9.
- Diao, H. L., Xue, Y., Han, X. H., Wang, S. Y., Liu, C., Chen, W. F. & Chen, L. (2017) Adenosine A. *Front Physiol*, 8, 897. 10.3389/fphys.2017.00897.
- Dong, J., Hawes, S., Wu, J., Le, W. & Cai, H. (2021) Connectivity and Functionality of the Globus Pallidus Externa Under Normal Conditions and Parkinson's Disease. *Front Neural Circuits*, 15, 645287. 10.3389/fncir.2021.645287.
- Dörnyei, G., Vass, Z., Juhász, C. B., Nádasy, G. L., Hunyady, L. & Szekeres, M. (2023) Role of the Endocannabinoid System in Metabolic Control Processes and in the Pathogenesis of Metabolic Syndrome: An Update. *Biomedicines*, 11(2). 10.3390/biomedicines11020306.
- Doss, C. G., Chakraborty, C., Chen, L. & Zhu, H. (2014) Integrating in silico prediction methods, molecular docking, and molecular dynamics simulation to predict the impact of ALK missense mutations in structural perspective. *Biomed Res Int*, 2014, 895831. 10.1155/2014/895831.
- Downes, G. B. & Gautam, N. (1999) The G protein subunit gene families. *Genomics*, 62(3), 544-52. 10.1006/geno.1999.5992.
- Doyon, J., Bellec, P., Amsel, R., Penhune, V., Monchi, O., Carrier, J., Lehericy, S. & Benali, H. (2009) Contributions of the basal ganglia and functionally related brain structures to motor learning. *Behav Brain Res*, 199(1), 61-75. 10.1016/j.bbr.2008.11.012.
- Drew, E. D. & Janes, R. W. (2020) Identification of a druggable binding pocket in the spike protein reveals a key site for existing drugs potentially capable of combating Covid-19 infectivity. *BMC Mol Cell Biol*, 21(1), 49. 10.1186/s12860-020-00294-x.
- Eid, L. & Parent, M. (2015) Morphological evidence for dopamine interactions with pallidal neurons in primates. *Front Neuroanat*, 9, 111. 10.3389/fnana.2015.00111.
- Eid, L. & Parent, M. (2016) Chemical anatomy of pallidal afferents in primates. *Brain Struct Funct*, 221(9), 4291-4317. 10.1007/s00429-016-1216-y.

- Elbegdorj, O., Westkaemper, R. B. & Zhang, Y. (2013) A homology modeling study toward the understanding of three-dimensional structure and putative pharmacological profile of the G-protein coupled receptor GPR55. *J Mol Graph Model*, 39, 50-60. 10.1016/j.jmglm.2012.10.005.
- Emmi, A., Antonini, A., Macchi, V., Porzionato, A. & De Caro, R. (2020) Anatomy and Connectivity of the Subthalamic Nucleus in Humans and Non-human Primates. *Front Neuroanat*, 14, 13. 10.3389/fnana.2020.00013.
- Fatemi, I., Abdollahi, A., Shamsizadeh, A., Allahtavakoli, M. & Roohbakhsh, A. (2021) The effect of intra-striatal administration of GPR55 agonist (LPI) and antagonist (ML193) on sensorimotor and motor functions in a Parkinson's disease rat model. *Acta Neuropsychiatr*, 33(1), 15-21. 10.1017/neu.2020.30.
- Fieblinger, T. (2021) Striatal Control of Movement: A Role for New Neuronal (Sub-) Populations? *Front Hum Neurosci*, 15, 697284. 10.3389/fnhum.2021.697284.
- Fink-Jensen, A., Suzdak, P. D., Swedberg, M. D., Judge, M. E., Hansen, L. & Nielsen, P. G. (1992) The gamma-aminobutyric acid (GABA) uptake inhibitor, tiagabine, increases extracellular brain levels of GABA in awake rats. *Eur J Pharmacol*, 220(2-3), 197-201. 10.1016/0014-2999(92)90748-s.
- Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L. G. & Schiöth, H. B. (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol*, 63(6), 1256-72. 10.1124/mol.63.6.1256.
- Gagnon, D., Petryszyn, S., Sanchez, M. G., Bories, C., Beaulieu, J. M., De Koninck, Y., Parent, A. & Parent, M. (2017) Striatal Neurons Expressing D. *Sci Rep*, 7, 41432. 10.1038/srep41432.
- Galeffi, F., Bianchi, L., Bolam, J. P. & Della Corte, L. (2003) The effect of 6-hydroxydopamine lesions on the release of amino acids in the direct and indirect pathways of the basal ganglia: a dual microdialysis probe analysis. *Eur J Neurosci*, 18(4), 856-68. 10.1046/j.1460-9568.2003.02795.x.
- Galvan, A. & Wichmann, T. (2008) Pathophysiology of parkinsonism. *Clin Neurophysiol*, 119(7), 1459-74. 10.1016/j.clinph.2008.03.017.

- Galvan, A., Devergnas, A. & Wichmann, T. (2015) Alterations in neuronal activity in basal ganglia-thalamocortical circuits in the parkinsonian state. *Front Neuroanat*, 9, 5. 10.3389/fnana.2015.00005.
- Galvan, A., Floran, B., Erlij, D. & Aceves, J. (2001) Intrapallidal dopamine restores motor deficits induced by 6-hydroxydopamine in the rat. *J Neural Transm (Vienna)*, 108(2), 153-66. 10.1007/s007020170085.
- Galvan, A., Villalba, R. M., West, S. M., Maidment, N. T., Ackerson, L. C., Smith, Y. & Wichmann, T. (2005) GABAergic modulation of the activity of globus pallidus neurons in primates: in vivo analysis of the functions of GABA receptors and GABA transporters. *J Neurophysiol*, 94(2), 990-1000. 10.1152/jn.00068.2005.
- García-Arencibia, M., González, S., de Lago, E., Ramos, J. A., Mechoulam, R. & Fernández-Ruiz, J. (2007) Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: importance of antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties. *Brain Res*, 1134(1), 162-70. 10.1016/j.brainres.2006.11.063.
- Gerfen, C. R. & Surmeier, D. J. (2011) Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annu Rev Neurosci*, 34, 441-66. 10.1146/annurev-neuro-061010-113641.
- Grinter, R. & Lithgow, T. (2019) The structure of the bacterial iron-catecholate transporter Fiu suggests that it imports substrates via a two-step mechanism. *J Biol Chem*, 294(51), 19523-19534. 10.1074/jbc.RA119.011018.
- Groenewegen, H. J. (2003) The basal ganglia and motor control. *Neural Plast*, 10(1-2), 107-20. 10.1155/NP.2003.107.
- Guo, P., Tai, Y., Wang, M., Sun, H., Zhang, L., Wei, W., Xiang, Y. K. & Wang, Q. (2022) $G\alpha$. *Front Cell Dev Biol*, 10, 809425. 10.3389/fcell.2022.809425.
- Gurevich, V. V. & Gurevich, E. V. (2020) Biased GPCR signaling: Possible mechanisms and inherent limitations. *Pharmacol Ther*, 211, 107540. 10.1016/j.pharmthera.2020.107540.
- Henstridge, C. M., Balenga, N. A., Ford, L. A., Ross, R. A., Waldhoer, M. & Irving, A. J. (2009) The GPR55 ligand L-alpha-lysophosphatidylinositol promotes RhoA-

- dependent Ca²⁺ signaling and NFAT activation. *FASEB J*, 23(1), 183-93. 10.1096/fj.08-108670.
- Henstridge, C. M., Balenga, N. A., Kargl, J., Andradas, C., Brown, A. J., Irving, A., Sanchez, C. & Waldhoer, M. (2011) Minireview: recent developments in the physiology and pathology of the lysophosphatidylinositol-sensitive receptor GPR55. *Mol Endocrinol*, 25(11), 1835-48. 10.1210/me.2011-1197.
 - Hernández, A., Sierra, A., Valdiosera, R., Florán, B., Erlij, D. & Aceves, J. (2007) Presynaptic D1 dopamine receptors facilitate glutamatergic neurotransmission in the rat globus pallidus. *Neurosci Lett*, 425(3), 188-91. 10.1016/j.neulet.2007.08.026.
 - Hernandez-Baltazar, D., Zavala-Flores, L. M. & Villanueva-Olivo, A. (2017) The 6-hydroxydopamine model and parkinsonian pathophysiology: Novel findings in an older model. *Neurologia*, 32(8), 533-539. 10.1016/j.nrl.2015.06.011.
 - Hopkins, A. L. & Groom, C. R. (2002) The druggable genome. *Nat Rev Drug Discov*, 1(9), 727-30. 10.1038/nrd892.
 - Huerta-Ocampo, I., Mena-Segovia, J. & Bolam, J. P. (2014) Convergence of cortical and thalamic input to direct and indirect pathway medium spiny neurons in the striatum. *Brain Struct Funct*, 219(5), 1787-800. 10.1007/s00429-013-0601-z.
 - Hurst, K., Badgley, C., Ellsworth, T., Bell, S., Friend, L., Prince, B., Welch, J., Cowan, Z., Williamson, R., Lyon, C., Anderson, B., Poole, B., Christensen, M., McNeil, M., Call, J. & Edwards, J. G. (2017) A putative lysophosphatidylinositol receptor GPR55 modulates hippocampal synaptic plasticity. *Hippocampus*, 27(9), 985-998. 10.1002/hipo.22747.
 - Jamwal, S. & Kumar, P. (2019) Insight Into the Emerging Role of Striatal Neurotransmitters in the Pathophysiology of Parkinson's Disease and Huntington's Disease: A Review. *Curr Neuropharmacol*, 17(2), 165-175. 10.2174/1570159X16666180302115032.
 - Jin, X. T., Galvan, A., Wichmann, T. & Smith, Y. (2011) Localization and Function of GABA Transporters GAT-1 and GAT-3 in the Basal Ganglia. *Front Syst Neurosci*, 5, 63. 10.3389/fnsys.2011.00063.

- Johns, D. G., Behm, D. J., Walker, D. J., Ao, Z., Shapland, E. M., Daniels, D. A., Riddick, M., Dowell, S., Staton, P. C., Green, P., Shabon, U., Bao, W., Aiyar, N., Yue, T. L., Brown, A. J., Morrison, A. D. & Douglas, S. A. (2007) The novel endocannabinoid receptor GPR55 is activated by atypical cannabinoids but does not mediate their vasodilator effects. *Br J Pharmacol*, 152(5), 825-31. 10.1038/sj.bjp.0707419.
- Junior, N. C. F., Dos-Santos-Pereira, M., Guimarães, F. S. & Del Bel, E. (2020) Cannabidiol and Cannabinoid Compounds as Potential Strategies for Treating Parkinson's Disease and L-DOPA-Induced Dyskinesia. *Neurotox Res*, 37(1), 12-29. 10.1007/s12640-019-00109-8.
- Kamato, D., Thach, L., Bernard, R., Chan, V., Zheng, W., Kaur, H., Brimble, M., Osman, N. & Little, P. J. (2015) Structure, Function, Pharmacology, and Therapeutic Potential of the G Protein, G α /q,11. *Front Cardiovasc Med*, 2, 14. 10.3389/fcvm.2015.00014.
- Kang, S., Yang, M., Hong, Z., Zhang, L., Huang, Z., Chen, X., He, S., Zhou, Z., Chen, Q., Yan, Y., Zhang, C., Shan, H. & Chen, S. (2020) Crystal structure of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein RNA binding domain reveals potential unique drug targeting sites. *Acta Pharm Sin B*, 10(7), 1228-1238. 10.1016/j.apsb.2020.04.009.
- Kapur, A., Zhao, P., Sharir, H., Bai, Y., Caron, M. G., Barak, L. S. & Abood, M. E. (2009) Atypical responsiveness of the orphan receptor GPR55 to cannabinoid ligands. *J Biol Chem*, 284(43), 29817-27. 10.1074/jbc.M109.050187.
- Kargl, J., Balenga, N. A., Platzer, W., Martini, L., Whistler, J. L. & Waldhoer, M. (2012) The GPCR-associated sorting protein 1 regulates ligand-induced down-regulation of GPR55. *Br J Pharmacol*, 165(8), 2611-9. 10.1111/j.1476-5381.2011.01562.x.
- Keener, A. M. & Bordelon, Y. M. (2016) Parkinsonism. *Semin Neurol*, 36(4), 330-4. 10.1055/s-0036-1585097.
- Kim, H. F. & Hikosaka, O. (2015) Parallel basal ganglia circuits for voluntary and automatic behaviour to reach rewards. *Brain*, 138(Pt 7), 1776-800. 10.1093/brain/awv134.

- Kirik, D., Rosenblad, C. & Björklund, A. (1998) Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Exp Neurol*, 152(2), 259-77. 10.1006/exnr.1998.6848.
- Kita, H. & Kita, T. (2011) Role of Striatum in the Pause and Burst Generation in the Globus Pallidus of 6-OHDA-Treated Rats. *Front Syst Neurosci*, 5, 42. 10.3389/fnsys.2011.00042.
- Kita, H. & Kitai, S. T. (1987) Efferent projections of the subthalamic nucleus in the rat: light and electron microscopic analysis with the PHA-L method. *J Comp Neurol*, 260(3), 435-52. 10.1002/cne.902600309.
- Klaus, A., Alves da Silva, J. & Costa, R. M. (2019) What, If, and When to Move: Basal Ganglia Circuits and Self-Paced Action Initiation. *Annu Rev Neurosci*, 42, 459-483. 10.1146/annurev-neuro-072116-031033.
- Klein, A., Metz, G. A., Papazoglou, A. & Nikkhah, G. (2007) Differential effects on forelimb grasping behavior induced by fetal dopaminergic grafts in hemiparkinsonian rats. *Neurobiol Dis*, 27(1), 24-35. 10.1016/j.nbd.2007.03.010.
- Kotsikorou, E., Madrigal, K. E., Hurst, D. P., Sharir, H., Lynch, D. L., Heynen-Genel, S., Milan, L. B., Chung, T. D., Seltzman, H. H., Bai, Y., Caron, M. G., Barak, L., Abood, M. E. & Reggio, P. H. (2011) Identification of the GPR55 agonist binding site using a novel set of high-potency GPR55 selective ligands. *Biochemistry*, 50(25), 5633-47. 10.1021/bi200010k.
- Kotsikorou, E., Sharir, H., Shore, D. M., Hurst, D. P., Lynch, D. L., Madrigal, K. E., Heynen-Genel, S., Milan, L. B., Chung, T. D., Seltzman, H. H., Bai, Y., Caron, M. G., Barak, L. S., Croatt, M. P., Abood, M. E. & Reggio, P. H. (2013) Identification of the GPR55 antagonist binding site using a novel set of high-potency GPR55 selective ligands. *Biochemistry*, 52(52), 9456-69. 10.1021/bi4008885.
- Kovaleski, R. F., Callahan, J. W., Chazalon, M., Wokosin, D. L., Baufreton, J. & Bevan, M. D. (2020) Dysregulation of external globus pallidus-subthalamic nucleus network dynamics in parkinsonian mice during cortical slow-wave activity and activation. *J Physiol*, 598(10), 1897-1927. 10.1113/JP279232.

- Lanciego, J. L., Luquin, N. & Obeso, J. A. (2012) Functional neuroanatomy of the basal ganglia. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(12), a009621. 10.1101/cshperspect.a009621.
- Laprade, N. & Soghomonian, J. J. (1999) Gene expression of the GAD67 and GAD65 isoforms of glutamate decarboxylase is differentially altered in subpopulations of striatal neurons in adult rats lesioned with 6-OHDA as neonates. *Synapse*, 33(1), 36-48. 10.1002/(SICI)1098-2396(199907)33:1<36::AID-SYN4>3.0.CO;2-0.
- Laprairie, R. B., Bagher, A. M. & Denovan-Wright, E. M. (2017) Cannabinoid receptor ligand bias: implications in the central nervous system. *Curr Opin Pharmacol*, 32, 32-43. 10.1016/j.coph.2016.10.005.
- Laprairie, R. B., Bagher, A. M., Kelly, M. E. & Denovan-Wright, E. M. (2015) Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB1 receptor. *Br J Pharmacol*, 172(20), 4790-805. 10.1111/bph.13250.
- Łątka, K., Jończyk, J. & Bajda, M. (2020) γ -Aminobutyric acid transporters as relevant biological target: Their function, structure, inhibitors and role in the therapy of different diseases. *Int J Biol Macromol*. 10.1016/j.ijbiomac.2020.04.126.
- Lauckner, J. E., Jensen, J. B., Chen, H. Y., Lu, H. C., Hille, B. & Mackie, K. (2008) GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(7), 2699-704. 10.1073/pnas.0711278105.
- Levoye, A., Dam, J., Ayoub, M. A., Guillaume, J. L. & Jockers, R. (2006) Do orphan G-protein-coupled receptors have ligand-independent functions? New insights from receptor heterodimers. *EMBO Rep*, 7(11), 1094-8. 10.1038/sj.embor.7400838.
- Leysen, H., Walter, D., Christiaenssen, B., Vandoren, R., Harputluoğlu, İ., Van Loon, N. & Maudsley, S. (2021) GPCRs Are Optimal Regulators of Complex Biological Systems and Orchestrate the Interface between Health and Disease. *Int J Mol Sci*, 22(24). 10.3390/ijms222413387.
- Lingerfelt, M. A., Zhao, P., Sharir, H. P., Hurst, D. P., Reggio, P. H. & Abood, M. E. (2017) Identification of Crucial Amino Acid Residues Involved in Agonist Signaling

at the GPR55 Receptor. *Biochemistry*, 56(3), 473-486. 10.1021/acs.biochem.6b01013.

- Mallet, N., Ballion, B., Le Moine, C. & Gonon, F. (2006) Cortical inputs and GABA interneurons imbalance projection neurons in the striatum of parkinsonian rats. *J Neurosci*, 26(14), 3875-84. 10.1523/JNEUROSCI.4439-05.2006.
- Mallet, N., Delgado, L., Chazalon, M., Miguezuez, C. & Baufreton, J. (2019) Cellular and Synaptic Dysfunctions in Parkinson's Disease: Stepping out of the Striatum. *Cells*, 8(9). 10.3390/cells8091005.
- Mangini, M., Iaccino, E., Mosca, M. G., Mimmi, S., D'Angelo, R., Quinto, I., Scala, G. & Mariggìò, S. (2017) Peptide-guided targeting of GPR55 for anti-cancer therapy. *Oncotarget*, 8(3), 5179-5195. 10.18632/oncotarget.14121.
- Marichal-Cancino, B. A., Fajardo-Valdez, A., Ruiz-Contreras, A. E., Mendez-Díaz, M. & Prospero-García, O. (2017) Advances in the Physiology of GPR55 in the Central Nervous System. *Curr Neuropharmacol*, 15(5), 771-778. 10.2174/1570159X14666160729155441.
- Marichal-Cancino, B. A., Sánchez-Fuentes, A., Méndez-Díaz, M., Ruiz-Contreras, A. E. & Prospero-García, O. (2016) Blockade of GPR55 in the dorsolateral striatum impairs performance of rats in a T-maze paradigm. *Behav Pharmacol*, 27(4), 393-6. 10.1097/FBP.0000000000000185.
- Martin, J., Kogo, N., Fan, T. X. & Ariel, M. (2003) Morphology of the turtle accessory optic system. *Vis Neurosci*, 20(6), 639-49. 10.1017/s0952523803206064.
- McCafferty, C. L., Marcotte, E. M. & Taylor, D. W. (2021) Simplified geometric representations of protein structures identify complementary interaction interfaces. *Proteins*, 89(3), 348-360. 10.1002/prot.26020.
- McIntire, W. E. (2009) Structural determinants involved in the formation and activation of G protein betagamma dimers. *Neurosignals*, 17(1), 82-99. 10.1159/000186692.
- Mendieta, L., Venegas, B., Moreno, N., Patricio, A., Martínez, I., Aguilera, J. & Limón, I. D. (2009) The carboxyl-terminal domain of the heavy chain of tetanus toxin prevents dopaminergic degeneration and improves motor behavior in rats

- with striatal MPP(+)-lesions. *Neurosci Res*, 65(1), 98-106. 10.1016/j.neures.2009.06.001.
- Metz, G. A. & Whishaw, I. Q. (2000) Skilled reaching an action pattern: stability in rat (*Rattus norvegicus*) grasping movements as a function of changing food pellet size. *Behav Brain Res*, 116(2), 111-22. 10.1016/s0166-4328(00)00245-x.
 - Moldavan, M., Cravetchi, O. & Allen, C. N. (2017) GABA transporters regulate tonic and synaptic GABA. *J Neurophysiol*, 118(6), 3092-3106. 10.1152/jn.00194.2017.
 - Montoya, C. P., Campbell-Hope, L. J., Pemberton, K. D. & Dunnett, S. B. (1991) The "staircase test": a measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats. *J Neurosci Methods*, 36(2-3), 219-28. 10.1016/0165-0270(91)90048-5.
 - Moriconi, A., Cerbara, I., Maccarrone, M. & Topai, A. (2010) GPR55: Current knowledge and future perspectives of a purported "Type-3" cannabinoid receptor. *Curr Med Chem*, 17(14), 1411-29. 10.2174/092986710790980069.
 - Musella, A., Freseigna, D., Rizzo, F. R., Gentile, A., Bullitta, S., De Vito, F., Guadalupi, L., Centonze, D. & Mandolesi, G. (2017) A novel crosstalk within the endocannabinoid system controls GABA transmission in the striatum. *Sci Rep*, 7(1), 7363. 10.1038/s41598-017-07519-8.
 - Ngo, T., Kufareva, I., Coleman, J. L. j., Graham, R. M., Abagyan, R. & Smith, N. J. (2016) Identifying ligands at orphan GPCRs: current status using structure-based approaches. *Br J Pharmacol*, 173(20), 2934-51. 10.1111/bph.13452.
 - Obeso, J. A., Rodriguez-Oroz, M. C., Lanciego, J. L. & Rodriguez Diaz, M. (2004) How does Parkinson's disease begin? The role of compensatory mechanisms. *Trends Neurosci*, 27(3), 125-7; author reply 127-8. 10.1016/j.tins.2003.12.006.
 - Oka, S., Nakajima, K., Yamashita, A., Kishimoto, S. & Sugiura, T. (2007) Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 362(4), 928-34. 10.1016/j.bbrc.2007.08.078.
 - Oka, S., Toshida, T., Maruyama, K., Nakajima, K., Yamashita, A. & Sugiura, T. (2009) 2-Arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphoinositol: a possible natural ligand for GPR55. *J Biochem*, 145(1), 13-20. 10.1093/jb/mvn136.

- Oken, A. C., Krishnamurthy, I., Savage, J. C., Lisi, N. E., Godsey, M. H. & Mansoor, S. E. (2022) Molecular Pharmacology of P2X Receptors: Exploring Druggable Domains Revealed by Structural Biology. *Front Pharmacol*, 13, 925880. 10.3389/fphar.2022.925880.
- Oldham, W. M. & Hamm, H. E. (2008) Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(1), 60-71. 10.1038/nrm2299.
- Ortiz Zacarías, N. V., Lenselink, E. B., IJzerman, A. P., Handel, T. M. & Heitman, L. H. (2018) Intracellular Receptor Modulation: Novel Approach to Target GPCRs. *Trends Pharmacol Sci*, 39(6), 547-559. 10.1016/j.tips.2018.03.002.
- Pandolfo, P., Silveirinha, V., dos Santos-Rodrigues, A., Venance, L., Ledent, C., Takahashi, R. N., Cunha, R. A. & Köfalvi, A. (2011) Cannabinoids inhibit the synaptic uptake of adenosine and dopamine in the rat and mouse striatum. *Eur J Pharmacol*, 655(1-3), 38-45. 10.1016/j.ejphar.2011.01.013.
- Parent, M., Wallman, M. J., Gagnon, D. & Parent, A. (2011) Serotonin innervation of basal ganglia in monkeys and humans. *J Chem Neuroanat*, 41(4), 256-65. 10.1016/j.jchemneu.2011.04.005.
- Paxinos, G. & Watson, C. (1998) *The rat brain in stereotactic coordinates*. London: Academic Press.
- Peres, F. F., Lima, A. C., Hallak, J. E. C., Crippa, J. A., Silva, R. H. & Abílio, V. C. (2018) Cannabidiol as a Promising Strategy to Treat and Prevent Movement Disorders? *Front Pharmacol*, 9, 482. 10.3389/fphar.2018.00482.
- Petitet, F., Donlan, M. & Michel, A. (2006) GPR55 as a new cannabinoid receptor: still a long way to prove it. *Chem Biol Drug Des*, 67(3), 252-3. 10.1111/j.1747-0285.2006.00370.x.
- Pinal, C. S. & Tobin, A. J. (1998) Uniqueness and redundancy in GABA production. *Perspect Dev Neurobiol*, 5(2-3), 109-18.
- Przedborski, S., Levivier, M., Jiang, H., Ferreira, M., Jackson-Lewis, V., Donaldson, D. & Togasaki, D. M. (1995) Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intra-striatal injection of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience*, 67(3), 631-47. 10.1016/0306-4522(95)00066-r.

- Rajput, A. H., Sitte, H. H., Rajput, A., Fenton, M. E., Pifl, C. & Hornykiewicz, O. (2008) Globus pallidus dopamine and Parkinson motor subtypes: clinical and brain biochemical correlation. *Neurology*, 70(16 Pt 2), 1403-10. 10.1212/01.wnl.0000285082.18969.3a.
- Rempel, V., Volz, N., Gläser, F., Nieger, M., Bräse, S. & Müller, C. E. (2013) Antagonists for the orphan G-protein-coupled receptor GPR55 based on a coumarin scaffold. *J Med Chem*, 56(11), 4798-810. 10.1021/jm4005175.
- Richerson, G. B. & Wu, Y. (2003) Dynamic equilibrium of neurotransmitter transporters: not just for reuptake anymore. *J Neurophysiol*, 90(3), 1363-74. 10.1152/jn.00317.2003.
- Rommelfanger, K. S. & Wichmann, T. (2010) Extrastriatal dopaminergic circuits of the Basal Ganglia. *Front Neuroanat*, 4, 139. 10.3389/fnana.2010.00139.
- Ross, R. A. (2009) The enigmatic pharmacology of GPR55. *Trends Pharmacol Sci*, 30(3), 156-63. 10.1016/j.tips.2008.12.004.
- Rubin, J. E., McIntyre, C. C., Turner, R. S. & Wichmann, T. (2012) Basal ganglia activity patterns in parkinsonism and computational modeling of their downstream effects. *Eur J Neurosci*, 36(2), 2213-28. 10.1111/j.1460-9568.2012.08108.x.
- Ryberg, E., Larsson, N., Sjögren, S., Hjorth, S., Hermansson, N. O., Leonova, J., Elebring, T., Nilsson, K., Drmota, T. & Greasley, P. J. (2007) The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*, 152(7), 1092-101. 10.1038/sj.bjp.0707460.
- Salon, J. A., Lodowski, D. T. & Palczewski, K. (2011) The significance of G protein-coupled receptor crystallography for drug discovery. *Pharmacol Rev*, 63(4), 901-37. 10.1124/pr.110.003350.
- Sánchez-Zavaleta, R., Ávalos-Fuentes, J. A., González-Hernández, A. V., Recillas-Morales, S., Paz-Bermúdez, F. J., Leyva-Gómez, G., Cortés, H. & Florán, B. (2022) Presynaptic nigral GPR55 receptors stimulate [Synapse, 76(11-12), e22246. 10.1002/syn.22246.
- Sawzdargo, M., Nguyen, T., Lee, D. K., Lynch, K. R., Cheng, R., Heng, H. H., George, S. R. & O'Dowd, B. F. (1999) Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, PsiGPR53 and GPR55: GPR55

is extensively expressed in human brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 64(2), 193-8. 10.1016/s0169-328x(98)00277-0.

- Schmandke, A. & Strittmatter, S. M. (2007) ROCK and Rho: biochemistry and neuronal functions of Rho-associated protein kinases. *Neuroscientist*, 13(5), 454-69. 10.1177/1073858407303611.
- Seeliger, D. & de Groot, B. L. (2010) Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. *J Comput Aided Mol Des*, 24(5), 417-22. 10.1007/s10822-010-9352-6.
- Shalaeva, D. N., Galperin, M. Y. & Mulkidjanian, A. Y. (2015) Eukaryotic G protein-coupled receptors as descendants of prokaryotic sodium-translocating rhodopsins. *Biol Direct*, 10, 63. 10.1186/s13062-015-0091-4.
- Sharir, H. & Abood, M. E. (2010) Pharmacological characterization of GPR55, a putative cannabinoid receptor. *Pharmacol Ther*, 126(3), 301-13. 10.1016/j.pharmthera.2010.02.004.
- Shen, S., Zhao, C., Wu, C., Sun, S., Li, Z., Yan, W. & Shao, Z. (2023) Allosteric modulation of G protein-coupled receptor signaling. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 14, 1137604. 10.3389/fendo.2023.1137604.
- Shi, Q. X., Yang, L. K., Shi, W. L., Wang, L., Zhou, S. M., Guan, S. Y., Zhao, M. G. & Yang, Q. (2017) The novel cannabinoid receptor GPR55 mediates anxiolytic-like effects in the medial orbital cortex of mice with acute stress. *Mol Brain*, 10(1), 38. 10.1186/s13041-017-0318-7.
- Shore, D. M. & Reggio, P. H. (2015) The therapeutic potential of orphan GPCRs, GPR35 and GPR55. *Front Pharmacol*, 6, 69. 10.3389/fphar.2015.00069.
- Smith, J. S., Lefkowitz, R. J. & Rajagopal, S. (2018) Biased signalling: from simple switches to allosteric microprocessors. *Nat Rev Drug Discov*, 17(4), 243-260. 10.1038/nrd.2017.229.
- Soghomonian, J. J. & Laprade, N. (1997) Glutamate decarboxylase (GAD67 and GAD65) gene expression is increased in a subpopulation of neurons in the putamen of Parkinsonian monkeys. *Synapse*, 27(2), 122-32. 10.1002/(SICI)1098-2396(199710)27:2<122::AID-SYN3>3.0.CO;2-G.

- Soghomonian, J. J. & Martin, D. L. (1998) Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? *Trends Pharmacol Sci*, 19(12), 500-5. 10.1016/s0165-6147(98)01270-x.
- Sylantsev, S., Jensen, T. P., Ross, R. A. & Rusakov, D. A. (2013) Cannabinoid- and lysophosphatidylinositol-sensitive receptor GPR55 boosts neurotransmitter release at central synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(13), 5193-8. 10.1073/pnas.1211204110.
- Tang, X. L., Wang, Y., Li, D. L., Luo, J. & Liu, M. Y. (2012) Orphan G protein-coupled receptors (GPCRs): biological functions and potential drug targets. *Acta Pharmacol Sin*, 33(3), 363-71. 10.1038/aps.2011.210.
- Tranzer, J. P. & Thoenen, H. (1973) Selective destruction of adrenergic nerve terminals by chemical analogues of 6-hydroxydopamine. *Experientia*, 29(3), 314-5. 10.1007/BF01926498.
- Turner, R. S. & Desmurget, M. (2010) Basal ganglia contributions to motor control: a vigorous tutor. *Curr Opin Neurobiol*, 20(6), 704-16. 10.1016/j.conb.2010.08.022.
- Ungerstedt, U. & Arbuthnott, G. W. (1970) Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res*, 24(3), 485-93. 10.1016/0006-8993(70)90187-3.
- Valdés-Tresanco, M. S., Valdés-Tresanco, M. E., Valiente, P. A. & Moreno, E. (2020) AMDock: a versatile graphical tool for assisting molecular docking with Autodock Vina and Autodock4. *Biol Direct*, 15(1), 12. 10.1186/s13062-020-00267-2.
- Villalba, R. M., Mathai, A. & Smith, Y. (2015) Morphological changes of glutamatergic synapses in animal models of Parkinson's disease. *Front Neuroanat*, 9, 117. 10.3389/fnana.2015.00117.
- Violin, J. D., Crombie, A. L., Soergel, D. G. & Lark, M. W. (2014) Biased ligands at G-protein-coupled receptors: promise and progress. *Trends Pharmacol Sci*, 35(7), 308-16. 10.1016/j.tips.2014.04.007.
- Wettschureck, N. & Offermanns, S. (2005) Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev*, 85(4), 1159-204. 10.1152/physrev.00003.2005.

- Wu, C. S., Chen, H., Sun, H., Zhu, J., Jew, C. P., Wager-Miller, J., Straiker, A., Spencer, C., Bradshaw, H., Mackie, K. & Lu, H. C. (2013) GPR55, a G-protein coupled receptor for lysophosphatidylinositol, plays a role in motor coordination. *PLoS One*, 8(4), e60314. 10.1371/journal.pone.0060314.
- Yang, H., Zhou, J. & Lehmann, C. (2016) GPR55 - a putative "type 3" cannabinoid receptor in inflammation. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 27(3), 297-302. 10.1515/jbcpp-2015-0080.
- Yelnik, J. (2002) Functional anatomy of the basal ganglia. *Mov Disord*, 17 Suppl 3, S15-21. 10.1002/mds.10138.
- Yin, H. H., Mulcare, S. P., Hilário, M. R., Clouse, E., Holloway, T., Davis, M. I., Hansson, A. C., Lovinger, D. M. & Costa, R. M. (2009) Dynamic reorganization of striatal circuits during the acquisition and consolidation of a skill. *Nat Neurosci*, 12(3), 333-41. 10.1038/nn.2261.
- Yoshida, M., Miyazato, M. & Kangawa, K. (2012) Orphan GPCRs and methods for identifying their ligands. *Methods Enzymol*, 514, 33-44. 10.1016/B978-0-12-381272-8.00002-7.
- Yuan, H., Sarre, S., Ebinger, G. & Michotte, Y. (2005) Histological, behavioural and neurochemical evaluation of medial forebrain bundle and striatal 6-OHDA lesions as rat models of Parkinson's disease. *J Neurosci Methods*, 144(1), 35-45. 10.1016/j.jneumeth.2004.10.004.
- Zhang, P. L., Chen, Y., Zhang, C. H., Wang, Y. X. & Fernandez-Funez, P. (2018) Genetics of Parkinson's disease and related disorders. *J Med Genet*, 55(2), 73-80. 10.1136/jmedgenet-2017-105047.
- Zhang, P., Kofron, C. M. & Mende, U. (2015) Heterotrimeric G protein-mediated signaling and its non-canonical regulation in the heart. *Life Sci*, 129, 35-41. 10.1016/j.lfs.2015.02.029.